

(4)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:
4. Dezember 2003 (04.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/100072 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12P 11/00** (74) Anwalt: **REITSTÖTTER, KINZEBACH & PARTNER**; Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP03/05423**

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. Mai 2003 (23.05.2003)

AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,
RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

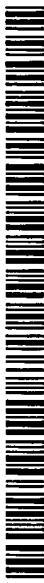
(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 03/100072 A2

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF SULPHUR-CONTAINING FINE CHEMICALS BY FERMENTATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR FERMENTATIVEN HERSTELLUNG SCHWEFELHALTIGER FEINCHEMIKALIEN

(57) Abstract: The invention relates to methods for the production of sulphur-containing fine chemicals by fermentation, in particular L-methionine, using bacteria in which a nucleotide sequence is expressed which codes for an S-adenosylmethionine synthase (metK) gene.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur fermentativen Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere LMethionin, unter Verwendung von Bakterien, in denen eine für ein S-Adenosylmethionin Synthase (metK)-Gen kodierende Nukleotidsequenz exprimiert wird.

**VERFAHREN ZUR FERMENTATIVEN HERSTELLUNG SCHWEFELHALTIGER
Beschreibung FEINCHEMIKALIEN**

Gegenstand der Erfindung ist neues Verfahren zur fermentativen Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin und L-Cystein, bei dem 5 Bakterien genutzt werden, in denen Nukleotidsequenzen exprimiert werden, die für Mutanten der S-Adenosylmethionin-Synthase (metK) (E.C.2.5.1.6) kodieren; Nukleotidsequenzen, welche für diese Mutanten kodieren, sowie die damit transformierten rekombinannten Mikroorganismen, sowie neuartige metK-Mutanten mit veränderter Enzymaktivität.

10 **Stand der Technik**

Schwefelhaltige Feinchemikalien, wie zum Beispiel Methionin, Homocystein, S-Adenosyl-Methionin, Glutathion, Cystein, Biotin, Thiamin, Liponsäure werden über natürliche Stoffwechselprozesse in Zellen hergestellt und werden in vielen Industriezweigen verwendet, 15 einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie. Diese Substanzen, die zusammen als "schwefelhaltige Feinchemikalien" bezeichnet werden, umfassen organische Säuren, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Vitamine und Cofaktoren. Ihre Produktion erfolgt am zweckmäßigsten im Großmaßstab mittels Anzucht von Bakterien, die entwickelt wurden, um große Mengen der 20 jeweils gewünschten Substanz zu produzieren und sezernieren. Für diesen Zweck besonders geeignete Organismen sind die gram-positiven, nicht-pathogenen coryneformen Bakterien.

Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer 25 Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie 30 zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zum Produkt, beispielsweise durch Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Über Stammselektion sind eine Reihe von Mutantenstämmen entwickelt worden, die ein Sortiment wünschenswerter Verbindungen aus der Reihe der schwefelhaltigen 35 Feinchemikalien produzieren. Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen hinsichtlich der Produktion eines bestimmten Moleküls werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Dies ist jedoch ein

zeitaufwendiges und schwieriges Verfahren. Auf diese Weise erhält man z.B. Stämme, die
resistent gegen Antimetabolite, wie z. B. die Methionin-Analoga α -Methyl-Methionin,
Ethionin, Norleucin, N-Acetylnorleucin, S-Trifluoromethylhomocystein, 2-Amino-5-
heptencarbonsäure, Seleno-Methionin, Methioninsulfoximin, Methoxin, 1-Aminocyclopentan-
5 Carbonsäure oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und
schwefelhaltige Feinchemikalien, wie z. B. L-Methionin, produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinannten DNA-Technik zur
Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierender Stämme von Corynebacterium
eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die
Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aus der JP-A-06-020809 ist eine Nukleotidsequenz für ein S-Adenosylmethionin kodierendes
Gen aus Brevibacterium flavum MJ-233, einem coryneformen Bakterium, bekannt. Die
15 korrespondierende Aminosäuresequenz umfasst 412 Aminosäuren. Das Protein weist unter
anderem in den Positionen 24 und 94 jeweils einen Cysteinrest auf, welche in den
entsprechenden Enzymen zahlreicher anderer coryneformer Bakterien konserviert sind. Die
offenbare Aminosäuresequenz besitzt einen charakteristischen Sequenzabschnitt zwischen
den Resten 137 und 154. Die Herstellung von Mutanten und deren Verwendung bei der
20 fermentativen Herstellung schwefelhaltiger Feinchemikalien ist darin nicht beschrieben

Aus der WO-A-01/00843 ist ein metK-Gen aus C. glutamicum bekannt, welches für ein
Protein mit 407 Aminosäuren kodiert und eine Sequenz gemäß SEQ ID NO:16 aufweist.

25 Verbesserungen der fermentativen Herstellung von Feinchemikalien korrelieren in der Regel
mit Verbesserungen von Stoffflüssen und Ausbeuten. Wichtig dabei ist es, Zwischen- oder
Endprodukthermmungen wichtiger Syntheseenzyme zu verhindern oder zu verringern.
Ebenso ist es von Vorteil, Abflüsse des Kohlenstoffflusses in ungewünschte Produkte oder
Seitenprodukte zu verhindern oder zu verringern.

30 Der Einfluss von Stoffwechselmetaboliten auf die enzymatischen Aktivitäten von
Stoffwechselenzymen kann untersucht werden. Beispiele für solche Enzyme können metA,
metB, metC, MetY, metH, metE, metF und weitere Enzyme im Stoffwechsel von
Mikroorganismen sein. Ein wichtiges Stoffwechselprodukt des Methionins und damit ein
35 wesentlicher Abfluß ist S-Adenosylmethionin.

Gleichzeitig ist S-Adenosylmethionin aber auch ein entscheidender Regulator der Methioninbiosynthese. Es ist zum Beispiel bekannt, dass die Biosynthese von L-Methionin in E. coli durch S-Adenosylmethionin inhibiert wird. S-Adenosylmethionin wirkt dort als ein Co-Repressor des Repressors metJ (Weissbach, H. Brot, N. (1991) Mol Microbiol. 5 (7), 1593-5 1597).

Die Synthese des S-Adenosylmethionins ist gleichzeitig ein wesentlicher Abfluß des gewünschten Wertproduktes L-Methionin. Deshalb ist es aus mehreren Gründen wünschenswert, die Menge des gebildeten S-Adenosylmethionins zu verringern:

- 10 a) die Menge des gebildeten L-Methionins würde erhöht,
- b) die Repression von Genen der Methionin-Biosynthese verringert und
- c) die Feedback-Inhibition von Enzymen der Methionin-Biosynthese würde verringert.

Die Deletion des metK Gens wäre der einfachste Weg, die Bildung des S-Adenosylmethionin zu verhindern. In Wei, Y. und Newman, E.B. (2002) Mol. Microbiol. 43 (6), 1651-1656 wird metK aber als ein essentielles Gen beschrieben und scheint somit für den Fachmann als Ansatzpunkt für eine verbesserte fermentative Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere von L-Methionin auszuscheiden.

20 Kurze Beschreibung der Erfindung

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein neues Verfahren zur verbesserten fermentativen Herstellung von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, und die dafür erforderlichen Mittel bereitzustellen.

25 Gelöst wird obige Aufgabe überraschenderweise durch Bereitstellung eines Verfahrens zur fermentativen Herstellung einer schwefelhaltigen Feinchemikalie, umfassend die Expression einer metK Nukleotidsequenz in einem coryneformen Bakterium, wobei die Nukleotidsequenz für eine S-Adenosylmethionin Synthase Mutante kodiert, deren Aktivität gegenüber dem Wildtyp Enzym verändert, vorzugsweise verringert, ist. Beispielsweise ist die Mutante von der S-Adenosylmethionin Synthase aus Corynebacterium glutamicum abgeleitet und zeigt, gemessen in Corynebacterium glutamicum, eine geringere Aktivität als das Wildtypenzym.

35 Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung wenigstens einer schwefelhaltigen Feinchemikalie, welches folgende Schritte umfasst:

- a) Fermentation einer die gewünschte schwefelhaltige Feinchemikalie produzierenden coryneformen Bakterienkultur, wobei in den coryneformen Bakterien zumindest eine Nukleotidsequenz exprimiert wird, welche für ein Protein mit veränderter S-Adenosylmethionin Synthase (metK)-Aktivität kodiert;
- 5 b) Anreicherung der schwefelhaltigen Feinchemikalie im Medium und/oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der schwefelhaltigen Feinchemikalie, welche vorzugsweise L-Methionin umfasst.
- 10 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform besitzt das mutierte coryneforme Bakterium außerdem eine, im Vergleich zum nichtmutierten Wildtyp, verbesserte metY Aktivität und/oder eine gesteigerte L-Methionin Menge (z.B. in g/l Fermentationsbrühe).
- 15 Im erfindungsgemäßen Verfahren wird als metK-kodierende Sequenz insbesondere eine kodierende Nukleotidsequenz verwendet?, welche für ein Protein mit verringriger metK-Aktivität kodiert, in welchem wenigstens ein Cysteinrest des Wildtypproteins substituiert ist.
- Vorzugsweise ist die metK-kodierende Sequenz eine kodierende Nukleotidsequenz, die für 20 ein Protein mit metK-Aktivität kodiert, welches folgende Aminosäureteilsequenz gemäß SEQ ID NO:23 aufweist:

G(F/Y)(D/S)X¹X²(S/T)X³(G/A)V

worin

X¹ und X² unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure stehen;

25 und

X³ für eine von Cys verschiedene Aminosäure steht.

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren gemäß obiger Definition, bei welchem die metK-kodierende Sequenz für ein Protein mit metK-Aktivität kodiert, wobei das Protein eine 30 Aminosäuresequenz von Val1 bis Ala407 gemäß SEQ ID NO: 22 oder eine dazu homologe Aminosäuresequenz, welche für ein Protein mit funktionaler Äquivalenz steht, umfasst.

Die erfindungsgemäß eingesetzte metK-kodierende Sequenz umfasst vorzugsweise eine 35 kodierende Sequenz gemäß SEQ ID NO: 21 oder eine dazu homologe Nukleotidsequenz, welche für ein Protein mit metK-Aktivität kodiert.

Die kodierende metK-Sequenz ist vorzugsweise eine in coryneformen Bakterien replizierbare oder eine stabil in das Chromosom integrierte DNA oder eine RNA.

- Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren
- 5 durchgeführt, indem man
- einen mit einem Plasmidvektor transformierten Bakterienstamm einsetzt, der wenigstens eine Kopie der kodierenden metK-Sequenz unter der Kontrolle regulativer Sequenzen trägt, oder
 - einen Stamm einsetzt, in dem die kodierende metK-Sequenz in das Chromosom des
- 10 Bakteriums integriert wurde.

Besonders bevorzugt sind Stämme obiger Definition in denen zusätzlich die Aktivität des metK-Wildtyp-Enzyms vollständig oder teilweise entfernt wurde, wie z.B. durch Deletion der kodierenden Sequenz des Wildtypenzyms.

- 15 Außerdem kann es wünschenswert sein, Bakterien zu fermentieren, in denen zusätzlich wenigstens ein weiteres Gen des Biosyntheseweges der gewünschten schwefelhaltigen Feinchemikalie verstärkt ist; und / oder in denen wenigstens ein Stoffwechselweg zumindest teilweise ausgeschaltet sind, der die Bildung der gewünschten schwefelhaltigen
- 20 Feinchemikalie verringert.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden deshalb coryneforme Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines der Gene, ausgewählt unter

- 25 1) dem für eine Aspartat Kinase kodierenden Gen lysC,
- 2) dem für eine Aspartat-Semialdehyd Dehydrogenase kodierenden Gen asd
- 3) dem für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierenden Gen gap,
- 4) dem für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierenden Gen pgk,
- 5) dem für die Pyruvat Carboxylase kodierenden Gen pyc,
- 30 6) dem für die Triosephosphat Isomerase kodierenden Gen tpi,
- 7) dem für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierenden Gen metA,
- 8) dem für die Cystathionin-gamma Synthase kodierenden Gen metB,
- 9) dem für die Cystathionin-gamma Lyase kodierenden Gen metC,
- 10) dem für die Methionin Synthase kodierenden Gen metH,
- 35 11) dem für die Serin Hydroxymethyltransferase kodierenden Gen glyA,
- 12) dem für die O-Acetylhomoserin Sulphydrylase kodierenden Gen metY,
- 13) dem für die Methylen-Tetrahydrofolat Reduktase kodieren Gen, metF

- 14) dem für die Phosphoserin Aminotransferase kodieren Gen serC
- 15) dem für die Phosphoserin Phosphatase kodieren Gen serB,
- 16) dem für die Serine Acetyl Transferase kodieren Gen cysE,
- 17) dem für die Cystein Synthase kodierenden Gen cysK,
- 5 18) dem für die Homoserin Dehydrogenase kodierenden Gen hom,
überexprimiert ist.

Gemäß einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden coryneforme Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines der Gene
10 ausgewählt unter Genen der oben genannten Gruppe 1) bis 18) so mutiert ist, dass die korrespondierenden Proteine, verglichen mit nicht mutierten Proteinen, in geringerem Maße oder nicht durch Stoffwechselmetabolite in ihrer Aktivität beeinflusst werden und dass insbesondere die erfindungsgemäße Produktion der Feinchemikalie nicht beeinträchtigt wird, oder so dass ihre spezifische enzymatische Aktivität gesteigert wird:

15

Gemäß einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden coryneforme Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines der Gene, ausgewählt unter

- 20 19) dem für die HomoserineKinase kodierenden Gen thrB,
- 20 20) dem für die Threonin Dehydratase kodierenden Gen ilvA,
- 21 21) dem für die Threonin Synthase kodierenden Gen thrC
- 22) dem für die Meso-Diaminopimelat D Dehydrogenase kodierenden Gen ddh
- 23) dem für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase kodierenden Gen pck,
- 24) dem für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierenden Gen pgi,
- 25 25) dem für die Pyruvat Oxidase kodierenden Gen poxB,
- 26) dem für die Dihydrodipicolinat Synthase kodiernden Gen dapA,
- 27) dem für die Dihydrodipicolinat Reduktase kodiern den Gen dapB; oder
- 28) dem für die Diaminopicolinat Decarboxylase kodiernden Gen lysA
abschwächt ist, insbesondere durch Verringerung der Expressionsrate des
30 korrespondierenden Gens.

Gemäß einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden coryneforme Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines der Gene der obigen Gruppen 19) bis 28) mutiert ist, so dass die enzymatische Aktivität des
35 korrespondierenden Proteins teilweise oder vollständig verringert wird.

Vorzugsweise werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines L-
5 Methionin-haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, welches folgende Schritte umfasst

- a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus, vorzugsweise mit verringrigerter metK-Aktivität gemäß obiger Definition, in einem Fermentationsmedium;
- 10 b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe;
- c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und
- d) Trocknung der gemäß b) und/oder c) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu
15 erhalten.

Die Erfindung betrifft außerdem isolierte Polynukleotide, die für ein Polypeptid mit verringrigerter metK-Aktivität gemäß obiger Definition kodieren; sowie metK-Mutanten mit verringriger Aktivität, welche von diesen Polynukleotiden kodiert werden.

20 Gegenstand der Erfindung sind außerdem rekombinante coryneforme Bakterien, die ein mutiertes metK Gen gemäß obige Definition exprimieren und insbesondere solche rekombinante coryneforme Bakterien welche das metK-Wildtypenzym nicht mehr exprimieren.

25 Bevorzugte rekombinante coryneforme Bakterien zeigen im Vergleich zum korrespondierenden Wildtypstamm wenigstens eines der folgenden Merkmale:

- a) geringeren intrazellulären S-Adenosylmethionin Titer (
- b) geringere intrazelluläre S-Adenosylmethionin Synthase Konzentration, oder
- 30 c) geringere Aktivität der S-Adenosylmethionin Synthase, bestimmt anhand der S-Adenosylmethionin Bildungsrate;

und zusätzlich gegebenenfalls wenigstens eines der folgenden Merkmale:

- d) verbesserte metY Aktivität, oder
- e) gesteigerte L-Methionin-Menge.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

a) Allgemeine Begriffe

- 5 Als Proteine mit der biologischen Aktivität der „S-Adenosylmethionin Synthase“, kurz auch metK genannt (E.C.2.5.1.6), werden solche Proteine bezeichnet, die in der Lage sind L-Methionin und ATP zu S-Adenosyl-Methionin umzusetzen. Dem Fachmann sind weitere Details des metK-Proteins bekannt. Die enzymatische Aktivität von metK kann durch Enzymtests nachgewiesen werden, Vorschriften dafür finden sich in: Markham, G.D. et al.
10 (1983) Methods in Enzymology 94:219-222.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfasst der Begriff „schwefelhaltige Feinchemikalie“ jegliche chemische Verbindung, die wenigstens ein Schwefelatom kovalent gebunden enthält und durch ein erfindungsgemäßes Fermentationsverfahrens zugänglich ist. Nichtlimitierende
15 Beispiele dafür sind Methionin, Homocystein, S-Adenosyl-Methionin, Cystein, und insbesondere Methionin und S-Adenosyl-Methionin.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfassen die Begriffe „L-Methionin“, „Methionin“, „Homocystein“ und „S-Adenosylmethionin“ auch die korrespondierenden Salze, wie z. B.
20 Methionin-Hydrochlorid oder Methionin-Sulfat.

„Polynukleotide“ bezeichnet im allgemeinen Polyribonukleotide (RNA) und Polydeoxyribonukleotide (DNA), wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

25 Unter "Polypeptiden" versteht man erfindungsgemäß Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Der Begriff „Stoffwechselmetabolit“ bezeichnet chemische Verbindungen, die im
30 Stoffwechsel von Organismen als Zwischen- oder auch Endprodukte vorkommen und die neben ihrer Eigenschaft als chemische Bausteine auch modulierende Wirkung auf Enzyme und ihre katalytische Aktivität haben können. Dabei ist aus der Literatur bekannt, dass solche Stoffwechselmetabolite sowohl hemmend als auch stimulierend auf die Aktivität von Enzymen wirken können (Biochemistry, Stryer, Lubert, 1995 W. H. Freeman & Company,
35 New York, New York.). In der Literatur ist auch beschrieben, dass es möglich ist durch Maßnahmen, wie Mutation der genomischen DNA durch UV-Strahlung, ionisierender Strahlung oder mutagene Substanzen und nachfolgender Selektion auf bestimmte

Phänotypen, in Organismen solche Enzyme zu produzieren, in denen die Beeinflussung durch Stoffwechselmetabolite verändert wurde (Sahm H., Eggeling L., de Graaf A. A. *Biological Chemistry* 381(9-10):899-910, 2000; Eikmanns BJ., Eggeling L., Sahm H. Antonie van Leeuwenhoek. 64:145-63, 1993-94). Diese veränderten Eigenschaften können auch

5 durch gezielte Maßnahmen erreicht werden. Dabei ist dem Fachmann bekannt, in Genen für Enzyme auch gezielt bestimmte Nukleotide der für das Protein kodierenden DNA so zu verändern, dass das aus der exprimierten DNA-Sequenz resultierende Protein bestimmte neue Eigenschaften aufweist. So kann zum Beispiel erreicht werden, dass die modulierende Wirkung von Stoffwechselmetaboliten gegenüber dem nicht veränderten Protein verändert

10 ist. Enzyme können auch derart in ihrer Aktivität beeinflusst werden, dass es zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit, oder zu einer Veränderung der Affinität gegenüber dem Substrat kommt.

Die Begriffe "exprimieren" bzw. "Verstärkung" oder „Überexpression“ beschreiben im Kontext

15 der Erfindung die Produktion bzw. Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden. Dazu kann man beispielsweise ein Gen in einen Organismus einbringen, ein vorhandenes Gen durch ein anderes Gen ersetzen, die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöhen, einen starken Promotor verwenden oder ein Gen verwenden, das für ein entsprechendes Enzym

20 mit einer hohen Aktivität kodiert und man kann gegebenenfalls diese Maßnahmen kombinieren.

Die Begriffe „abschwächen“ und „verringern“ beschreiben im Kontext der Erfindung die Abschwächung oder Verringerung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme

25 in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden. Dazu kann man beispielsweise ein Gen in einem Organismus deletieren, ein vorhandenes Gen durch ein anderes Gen ersetzen, die Kopienzahl eines Transkriptes des Gens bzw. der Gene erniedrigen, einen schwachen Promotor verwenden oder ein Gen verwenden, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigeren Aktivität kodiert und man kann gegebenenfalls

30 diese Maßnahmen kombinieren.

Die „verringerte Aktivität“ einer erfindungsgemäßen S-Adenosylmethionin Synthase-Mutante oder eines funktionelle Äquivalents kann durch den Vergleich mit der Aktivität der nativen S-Adenosylmethionin Synthase, wie z.B. aus *Corynebacterium glutamicum* Wildtyp, ATCC

35 13032, bestimmt werden. Geeigneterweise bringt man dazu Plasmide, die in *Corynebacterium glutamicum* replizieren, und die die Gene für S-Adenosylmethionin Synthase-Mutanten tragen, durch Transformation z.B. in *Corynebacterium glutamicum* Wildtyp, ATCC

13032 ein. Außerdem bringt man entsprechende Plasmide in *Corynebacterium glutamicum* Wildtyp, ATCC 13032 ein, die das Wildtypenzym S-Adenosylmethionin Synthase exprimieren. Solchermaßen erhaltene *Corynebacterium glutamicum* Transformanten werden in geeigneten Medien kultiviert und in der logarithmischen Phase des Wachstums bei gleicher OD₆₀₀ geerntet. Danach werden aus den geernteten Zellen beider Transformanten nach bekannten Protokollen Proteinextrakte hergestellt. Gleiche Mengen dieser Proteinextrakte (nach Proteinbestimmung) werden dann in einen S-Adenosylmethionin Synthase Assay nach Markham, G.D. et al. (1983) Methods in Enzymology 94: 219-222 eingesetzt. Die Radioaktivität des gebildeten S-Adenosylmethionins wird in einem Szintillationszähler bestimmt. Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität des radioaktiven L-Methionins, sowie der eingesetzten Proteinmenge lässt sich die Rate der S-Adenosylmethionin-Bildung aus der Zunahme der eingebauten Radioaktivität pro Zeiteinheit bestimmen. Ihre Einheit lautet $\mu\text{mol S-Adenosylmethionin/min} \cdot \text{mg Protein}$. Diese Rate kann zwischen Wildtypenzym und Mutantenenzym verglichen werden. Nach dem gleichen Prinzip sind ausgehend von anderen Wildtyp-Enzymen mit S-Adenosylmethionin Synthase-Aktivität erfindungsgemäß brauchbare Mutanten herstellbar.

Eine „verringerte Aktivität“ erfindungsgemäß ist insbesondere dann gegeben, wenn die spezifische Aktivität der Mutante auf eine Restaktivität von etwa 1 bis 90 %, vorzugsweise 3 bis 70%, wie z.B. 5 bis 10% der Wildtyp-Aktivität verringert ist.

b) Erfindungsgemäße metK-Proteine

Die erfindungsgemäßen Polynukleotidsequenzen kodieren für Proteine mit veränderter, insbesondere verringelter S-Adenosylmethionin Synthase Aktivität gemäß obiger Definition.

Vorzugsweise sind die erfindungsgemäß brauchbaren Mutanten durch Substitution eines oder mehrerer konservierter Cysteinreste innerhalb der metK-Aminosäuresequenz grampositiver und/oder grammnegativer, oder insbesondere coryneformer Bakterien zugänglich. Konservierte Cysteinreste sind anhand von Sequenzalignments leicht feststellbar. Als nichtlimitierendes Beispiel für konservierte Cys-Reste in S-Adenosylmethionin Synthasen aus Bakterien sind Cys24 und Cys94 der Enzyms aus *C. glutamicum* zu nennen, welche in einer Vielzahl von Bakterien zu finden sind.

In einer bevorzugten Gruppe von erfindungsgemäßen Mutanten sind Cys24 und/oder Cys94 (gemäß metK aus *C. glutamicum* ATCC 13032) durch eine von Cys verschiedene

Aminosäure, vorzugsweise Alanin, substituiert, wodurch die Enzymaktivität in obiger Weise verringert wird.

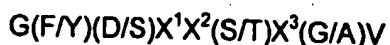
„Funktionale Äquivalente“ oder Analoga der konkret offenbarten Polypeptide sind im Rahmen 5 der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Polypeptide, welche weiterhin die gewünschte biologische Aktivität, wie z.B. Substratspezifität, besitzen.

- Unter „funktionalen Äquivalenten“ versteht man erfindungsgemäß insbesondere Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die 10 konkret genannte Aminosäure aufweisen aber trotzdem eine der oben genannten biologische Aktivität besitzen. „Funktionale Äquivalente“ umfassen somit die durch eine oder mehrere Aminosäure-Additionen, -Substitutionen, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit dem erfindungsgemäßigen 15 Eigenschaftsprofil führen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Reaktivitätsmuster zwischen Mutante und unverändertem Polypeptid qualitativ übereinstimmen, d.h. beispielsweise gleiche Substrate mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.
- 20 „Funktionale Äquivalente“ umfassen natürlich auch Polypeptide welche aus anderen Organismen zugänglich sind, sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.
- 25 „Funktionale Äquivalente“ umfassen ebenfalls Fragmente, vorzugsweise einzelne Domänen oder Sequenzmotive, der erfindungsgemäßen Polypeptide, welche z.B. die gewünschte biologische Funktion aufweisen.
- „Funktionale Äquivalente“ sind außerdem Fusionsproteine, welche ein der oben genannten 30 Polypeptidsequenzen oder davon abgeleitete funktionale Äquivalente und wenigstens eine weitere, davon funktionell verschiedene, heterologe Sequenz in funktioneller N- oder C-terminaler Verknüpfung (d.h. ohne gegenseitigen wesentliche funktionelle Beeinträchtigung der Fusionsproteinteile) aufweisen. Nichtlimitierende Beispiele für derartige heterologe Sequenzen sind z.B. Signalpeptide, Enzyme, Immunoglobuline, Oberflächenantigene, 35 Rezeptoren oder Rezeptorliganden.

- Erfindungsgemäß mit umfasste „funktionale Äquivalente“ sind Homologe zu den konkret offenbarten Proteinen. Diese besitzen wenigstens 20%, 30%, oder etwa 40%, 50 %, vorzugsweise wenigstens etwa 60 %, 65%, 70%, oder 75% insbesondere wenigstens 85 %, wie z.B. 90%, 95% oder 99%, Homologie zu einer der konkret offenbarten Sequenzen,
- 5 berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448.

Insbesondere sind Mutanten und funktionale Analoga bevorzugt, welche die charakteristische Teilsequenz

10



- gemäß obiger Definition enthalten; wobei X^3 eine von Cys verschiedene, durch Mutation eingeführte Aminosäure, insbesondere Alanin, darstellt. X^3 entspricht Cys94 der metK 15 Wildtyp-Sequenz von C. glutamicum (SEQ ID NO:16). X^2 steht vorzugsweise für Ala, Glu, Asp, Asn oder Arg; und X^1 steht vorzugsweise für Gly, Cys, Ser oder Ala.

- Homologe der erfundungsgemäßen Proteine oder Polypeptide können durch Mutagenese erzeugt werden, z.B. durch Punktmutation oder Verkürzung des Proteins. Der Begriff 10 „Homolog“, wie er hier verwendet wird, betrifft eine variante Form des Proteins, die als Agonist oder Antagonist der Protein-Aktivität wirkt.

- Homologe des erfundungsgemäßen Proteine können durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, wie z.B. Verkürzungsmutanten, identifiziert werden. Beispielsweise 5 kann eine variegierte Bank von Protein-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt werden, wie z.B. durch enzymatisches Ligieren eines Gemisches synthetischer Oligonukleotide. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller Homologer aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer 10 degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt werden, und das synthetische Gen kann dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen in einem Gemisch, die den gewünschten Satz an potentiellen Proteinsequenzen codieren. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind dem Fachmann bekannt (z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev.

Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

- Zusätzlich können Banken von Fragmenten des Protein-Codons verwendet werden, um eine variegierte Population von Protein-Fragmenten zum Screening und zur anschließenden Selektion von Homologen eines erfindungsgemäßen Proteins zu erzeugen. Bei einer Ausführungsform kann eine Bank von kodierenden Sequenzfragmenten durch Behandeln eines doppelsträngigen PCR-Fragmentes einer kodierenden Sequenz mit einer Nuklease unter Bedingungen, unter denen ein Nicking nur etwa einmal pro Molekül erfolgt,
- 5 Denaturieren der doppelsträngigen DNA, Renaturieren der DNA unter Bildung doppelsträngiger DNA, die Sense-/Antisense-Paare von verschiedenen genickten Produkten umfassen kann, Entfernen einzelsträngiger Abschnitte aus neu gebildeten Duplices durch Behandlung mit S1-Nuclease und Ligieren der resultierenden Fragmentbank in einen Expressionsvektor erzeugt werden. Durch dieses Verfahren kann eine Expressionsbank
- 10 hergeleitet werden, die N-terminale, C-terminale und interne Fragmente mit verschiedenen Größen des erfindungsgemäßen Proteins kodiert.
- 15

Im Stand der Technik sind mehrere Techniken zur Mutagenese von Genen bekannt: Coco, WM et al. 2001. DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. Nature Biotechnol. 19:354–359; DE 19953854; Leung DW et al. 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. Technique 1:11–15; Stemmer WPC 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. Proc. Natl. Acad. Sci USA 91:10747–10751; und US 5811238. Diese Verfahren sind zur Herstellung erfindungsgemäß brauchbarer Mutanten einsetzbar.

Im Stand der Technik sind mehrere Techniken zum Screening von Genprodukten kombinatorischer Banken, die durch Punktmutationen oder Verkürzung hergestellt worden sind, und zum Screening von cDNA-Banken auf Genprodukte mit einer ausgewählten Eigenschaft bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Screening der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese von erfindungsgemäßer Homologer erzeugt worden sind. Die am häufigsten verwendeten Techniken zum Screening großer Genbanken, die einer Analyse mit hohem Durchsatz unterliegen, umfassen das Klonieren der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren der geeigneten Zellen mit der resultierenden Vektorenbank und Exprimieren der kombinatorischen Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten Aktivität die Isolation des Vektors, der das Gen codiert, dessen Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert. Recursive-

Ensemble-Mutagenese (REM), eine Technik, die die Häufigkeit funktioneller Mutanten in den Banken vergrößert, kann in Kombination mit den Screeningtests verwendet werden, um Homologe zu identifizieren (Arkin und Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331.

5

c) Erfindungsgemäße Polynukleotide

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Nukleinsäuresequenzen (einzel- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen, wie z.B. cDNA und mRNA), kodierend für ein erfundungsgemäßes metK-Enzym und deren funktionalen Äquivalenten, welche z.B. auch unter Verwendung künstlicher Nukleotidanaloga zugänglich sind.

Die Erfindung betrifft sowohl isolierte Nukleinsäuremoleküle, welche für erfundungsgemäße Polypeptide bzw. Proteine oder biologisch aktive Abschnitte davon kodieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die z.B. als Hybridisierungssonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung von erfundungsgemäßer kodierenden Nukleinsäuren verwendet werden können.

Die erfundungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem untranslatierte Sequenzen vom 3'- und/oder 5'-Ende des kodierenden Genbereichs enthalten

Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

30

Die erfundungsgemäßen Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologer Sequenzen in anderen Zelltypen und Organismen verwendbar sind. Solche Sonden bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B. etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfundungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges hybridisiert.

Weitere erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO:21 und unterscheiden sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide, kodieren aber weiterhin für Polypeptide mit dem gewünschten Eigenschaftsprofil. Dies können Polynukleotide sein, die zu obigen Sequenzen in mindestens 5 etwa 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80% oder 90%, vorzugsweise in mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% der Sequenzpositionen identisch sind.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen 10 Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Allelvarianten, davon. Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotidsubstitutionen (d.h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.

15

Gegenstand der Erfindung sind auch die durch Sequenzpolymorphismen von den konkret offenbarten Nukleinsäuren abgeleiteten Moleküle. Diese genetischen Polymorphismen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund der natürlichen Variation existieren. Diese natürlichen Variationen bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % 20 in der Nukleotidsequenz eines Gens.

Weiterhin umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, welchen mit oben genannten kodierenden Sequenzen hybridisieren oder dazu komplementär sind. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Banken auffinden und 25 gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Eine weitere Möglichkeit bietet die Transformation geeigneter Mikroorganismen mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Vektoren, die Vermehrung der Mikroorganismen und damit der Polynukleotide und deren anschließende Isolierung. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Polynukleotide auch 30 auf chemischem Wege synthetisiert werden.

Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide „hybridisieren“ zu können, versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische 35 Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen zu 70-100%, vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich

beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen versteht man beispielsweise in der Northern-Blot-Technik die Verwendung einer 50 – 70 °C, vorzugsweise 60 – 65 °C

- 5 warmen Waschlösung, beispielsweise 0,1x SSC-Puffer mit 0,1% SDS (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0) zur Elution unspezifisch hybridisierter cDNA-Sonden oder Oligonukleotide. Dabei bleiben, wie oben erwähnt, nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander gebunden. Die Einstellung stringenter Bedingungen ist dem Fachmann bekannt und ist z.B. in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology,
10 John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

d) Isolierung der kodierenden metK-Gene und anderer Gene

Die für das Enzym S-Adenosylmethionin-Synthase (EC 2.5.1.6) kodierenden metK Gene

- 15 sind in an sich bekannter Weise isolierbar.

Zur Isolierung der metK-Gene oder auch anderer Gene anderer Organismen wird zunächst eine Genbank dieses Organismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern ausführlich

- 20 beschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (198)) in λ-Vektoren angelegt
25 wurde.

Zur Herstellung einer Genbank in E. coli können Cosmide, wie der Cosmidvektor SuperCos I (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84: 2160-2164), aber auch Plasmide, wie pBR322 (Bolivar; Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9

- 30 (Vieira et al., 1982, Gene, 19: 259-268), verwendet werden. Als Wirt eignen sich besonders solche E. coli Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5αmr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die
35 Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so

wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74: 5463-5467, 1977) beschrieben ist.

- Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw.
5 Sequenzanalyse-Programmen, wie z. B. dem von Staden (Nucleic Acids Research (1986) 14: 217-232), dem von Marck (Nucleic Acids Research (1988) 16, 1829-1836) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis (1998) 39, 74-97), untersucht werden.
- 10 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide für Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion
15 (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

- Weiterhin ist bekannt, dass Änderungen am N- und/oder C- Terminus eines Proteins dessen
20 Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (1987) Journal of Bacteriology 169: 751-757, bei O'Regan et al. (1989) Gene 77: 237-251, bei Sahin-Toth et al. (1994) Protein Sciences 3: 240-247, bei Hochuli et al. (1988) Biotechnology 6: 1321-1325 und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

25 e) Erfindungsgemäß verwendete Wirtszellen

Für das erfundungsgemäße Verfahren verwendet man vorzugsweise coryneforme Bakterien, deren verringerte metK-Aktivität über wenigstens eine der folgenden Eigenschaften
10 nachweisbar ist:

- a) einen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm geringeren intrazellulären S-Adenosylmethionin Titer;
- b) eine geringere intrazelluläre S-Adenosylmethionin Synthase Konzentration (weniger S-Adenosylmethionin Synthase bezogen auf Gesamtprotein); oder
15 c) eine geringere intrazelluläre S-Adenosylmethionin Synthase Aktivität (weniger S-Adenosylmethionin Synthase Enzymaktivität bezogen auf S-Adenosylmethionin Synthase-Proteingehalt).

Sämtliche dieser Eigenschaften sind in einfacher Weise vom Fachmann, gegebenenfalls unter Heranziehung der vorliegenden Beschreibung, bestimmbar.

Weitere Gegenstände der Erfindung betreffen insbesondere als Wirtszelle dienende

- 5 Mikroorganismen, insbesondere coryneforme Bakterien, die einen Vektor, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, der wenigstens ein metK Gen erfindungsgemäß definierter Trägt, enthalten oder in denen ein erfindungsgemäßes metK Gen mit verringelter Aktivität exprimiert ist.
- 10 Diese Mikroorganismen können schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Vorzugsweise sind dies coryneforme Bakterien, insbesondere der Gattung Corynebacterium. Aus der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre
15 Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Als Beispiele für geeignete Stämme coryneformer Bakterien sind solche der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), wie *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032,

- 20 *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806,
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870,
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539,
Corynebacterium melassecola ATCC 17965

- 25 oder
der Gattung *Brevibacterium*, wie
Brevibacterium flavum ATCC 14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC 14020 zu nennen;

- 30 oder davon abgeleitete Stämme, wie
Corynebacterium glutamicum KFCC10065
Corynebacterium glutamicum ATCC21608

welche ebenfalls die gewünschte Feinchemikalie oder deren Vorstufe(n) produzieren,
35 aufgeführt. (KFCC = Korean Federation of Culture Collection; ATCC = American Type Culture Collection)

f) Durchführung der erfindungsgemäßen Fermentation

Erfindungsgemäß wurde festgestellt, dass coryneforme Bakterien nach Expression eines erfindungsgemäßen metK Gens in vorteilhafter Weise schwefelhaltige Feinchemikalien, 5 insbesondere L-Methionin, produzieren.

Um die Aktivität oder Menge eines Enzyms, z.B. der S-Adenosylmethionin Synthase, metK, zu verringern, kann der Fachmann unterschiedliche Maßnahmen einzeln oder in Kombinationen ausführen. Durch Reduktion der Transkriptionshäufigkeit des Gens, das für 10 das erfundungsgemäße Protein kodiert, kann die Konzentration des betreffenden Proteins gesenkt werden. Dies kann der Fachmann durch Veränderung oder Austausch der Promotor- oder Regulationsregion, sowie der Ribosomenbindungsstelle des kodierenden Gens erreichen. Stromab der kodierenden Region kann der Fachmann Terminatoren verändern oder Sequenzen einfügen, die zu einer verringerten Stabilität des Transkriptes 15 führen. Diese, die Lebensdauer der mRNA verringernden Maßnahmen ermöglichen, die Expression des zugehörigen Proteins, und damit seine Konzentration abzusenken.

Auf der Ebene des exprimierten Enzyms können fusionierte Sequenzen zu einer erhöhten Abbaurate und damit ebenfalls zu einer Absenkung der Konzentration des Proteins führen. 20 Außerdem kann der Fachmann durch gezielte oder ungerichtete Mutagenese des kodierenden Gens die Aktivität, die Substrataffinität und die Substratspezifität verändern. Enzyme können durch Mutationen in den korrespondierenden Genen derart in ihrer Aktivität beeinflußt werden, dass es zu einer teilweisen oder vollständigen Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion kommt. Beispiele für solche 25 Mutationen sind dem Fachmann bekannt (Motoyama H. Yano H. Terasaki Y. Anazawa H. Applied & Environmental Microbiology. 67:3064-70, 2001, Eikmanns BJ. Eggeling L. Sahm H. Antonie van Leeuwenhoek. 64:145-63, 1993-94) Mutanten des Proteins können auch zu verringrigerter oder verhinderter Homo- oder Heteromultimerisierung von Enzymkomplexen und damit ebenfalls zu einer Verschlechterung der enzymatischen Eigenschaften führen.

30 Solchermaßen veränderte Gene können entweder in Plasmiden oder bevorzugt im Chromosom integriert vorliegen. Dabei kann das ursprüngliche, nicht auf diese Art veränderte Gen noch zusätzlich vorhanden sein, bevorzugt aber gegen das veränderte Gen ausgetauscht sein.

- Um die Aktivität eines Enzyms, z.B. der S-Adenosylmethionin Synthase (metK), gemessen in einem coryneformen Bakterium, zu verringern, kann es ausreichend sein, Gene, die für funktionale Äquivalente, wie künstlich hergestellte Mutanten oder natürliche Homologe aus anderen Organismen kodieren, zu exprimieren. Dabei kann das ursprüngliche Gen noch 5 zusätzlich vorhanden sein, bevorzugt aber gegen das veränderte oder homologe Gen ausgetauscht sein.

- Zusätzlich kann es für die Produktion von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, durch Fermentation in coryneformen Bakterien, vorteilhaft sein, neben einer 10 Expression eines erfindungsgemäßen metK-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, des Cystein-Stoffwechselwegs, der Aspartatsemialdehyd-Synthese, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken.
- 15 So kann für die Herstellung von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, eines oder mehrere der folgenden Gene verstärkt sein:
- das für eine Aspartatkinase kodierende Gen lysC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 281),
 - das für eine Aspartat-Semialdehyd kodierende Gen asd (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 282),
- 20 - das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
 - das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- 25 - das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 725),
- 30 - das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3491),
- das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen metC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3061),
 - das für die Cystathionin-Synthase kodierende Gen meth (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1663),
- 35 - das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1110),

- das für die O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase kodierende Gen metY (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 726),
 - das für die Methylentetrahydrofolat-Reduktase kodierende Gen metF (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2379),
- 5 - das für die Phosphoserin-Aminotransferase kodierende Gen serC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 928)
- eines für die Phosphoserin-Phosphatase kodierende Gen serB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 334, DNA-SEQ NO. 467, DNA-SEQ NO. 2767)
 - das für die Serine Acetyl-Transferase kodierende Gen cysE (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ
- 10 NO. 2818)
- das für die Cystein-Synthase kodierende Gen cysK (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2817),
 - das für eine Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1306)
- 15 So kann für die Herstellung von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin in coryneformen Bakterien, vorteilhaft sein, gleichzeitig wenigstens eines der nachfolgenden Gene zu mutieren, so dass die korrespondierenden Proteine, verglichen mit nicht mutierten Proteinen, in geringerem Maße oder nicht durch einen Stoffwechselmetaboliten in ihrer
- ?0 Aktivität beeinflusst werden oder so dass ihre spezifische Aktivität gesteigert wird:
- das für eine Aspartatkinase kodierende Gen lysC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 281),
 - das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- :5 - das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 725),
- das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3491),
 - das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen metC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ
- 0 NO. 3061),
- das für die Methionin-Synthase kodierende Gen metH (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1663),
 - das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1110),
- 5 - das für die O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase kodierende Gen metY (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 726),

- das für die Methylentetrahydrofolat-Reduktase kodierende Gen metF (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2379),
 - das für die Phosphoserin-Aminotransferase kodierende Gen serC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 928)
- 5 - eines für die Phosphoserin-Phosphatase kodierende Gen serB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 334, DNA-SEQ NO. 467, DNA-SEQ NO. 2767)
- das für die Serine Acetyl-Transferase kodierende Gen cysE (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2818)
 - das für die Cystein-Synthase kodierende Gen cysK (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO.
- 10 2817),
- das für eine Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1306)

Weiterhin kann es für die Produktion von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-
15 Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Expression eines der erfindungsgemäßen metK-
Gene eines oder mehrere der folgenden Gene abzuschwächen, insbesondere deren
Expression zu verringern, oder auszuschalten:

- das für die Homoserine-Kinase kodierende Gen thrB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO.
?0 3453)
 - das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO.
2328)
 - das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO.
3486)
- !5 - das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh (EP 1 108 790
A2; DNA-SEQ NO. 3494)
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (EP 1 108 790 A2;
DNA-SEQ NO. 3157)
 - das für die Glucose-6-Phosphat-6-Isomerase kodierende Gen pgi (EP 1 108 790 A2; DNA-
?0 SEQ NO. 950)
 - das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2873)
 - das für die Dihydrodipicolinat Synthase kodiernde Gen dapA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ
NO. 3476)
 - das für die Dihydrodipicolinat Reduktase kodierende Gen dapB (EP 1 108 790 A2; DNA-
5 SEQ NO. 3477)
 - das für die Diaminopicolinat Decarboxylase kodiernde Gen lysA (EP 1 108 790 A2; DNA-
SEQ NO. 3451)

Weiterhin kann es für die Produktion von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Expression eines der erfindungsgemäßen metK-Gene in coryneformen Bakterien gleichzeitig wenigstens eines der folgenden Gene so zu mutieren, dass die enzymatische Aktivität des korrespondierenden Proteins teilweise oder

5 vollständig verringert wird:

- das für die Homoserine-Kinase kodierende Gen thrB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3453)

- das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 10 2328)

- das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3486)

- das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3494)

15 - das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3157)

- das für die Glucose-6-Phosphat-6-Isomerase kodierende Gen pgi (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 950)

- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2873)

20 - das für die Dihydrodipicolinat Synthase kodierende Gen dapA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3476)

- das für die Dihydrodipicolinat Reduktase kodierende Gen dapB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3477)

- das für die Diaminopicolinat Decarboxylase kodierende Gen lysA (EP 1 108 790 A2; DNA-
15 SEQ NO. 3451)

Weiterhin kann es für die Produktion von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, neben der Expression eines erfindungsgemäßen metK-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid

20 Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Zur Erzielung einer Überexpression kann der Fachmann unterschiedliche Maßnahmen einzeln oder in Kombination ergreifen. So kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene

5 erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden.

In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens

eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Methionin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die

- 5 Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein.

Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

- 10 Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Biotechnology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der EP 0472869, in US 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991)), bei Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.
- 15

20

Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte. Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßigen

- 25 Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer „operativen Verknüpfung“ versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart,

- 30 dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Aktivierungssequenzen sowie Enhancer und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen. Geeignete regulatorische Sequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel, Gene

- 35 Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch 5 einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten 10 sein.

Beispiele für brauchbare Promotoren sind: die Promotoren, ddh, amy, lysC, dapA, lysA aus Corynebacterium glutamicum, aber auch gram-positive Promotoren, wie SPO2 wie sie in Bacillus Subtilis and Its Closest Relatives, Sonenshein, Abraham L., Hoch, James A., Losick, 15 Richard; ASM Press, District of Columbia, Washington und Patek M. Eikmanns BJ. Patek J. Sahm H. Microbiology. 142 1297-309, 1996 beschrieben sind, oder aber auch cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lac-, lac-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, I-PR- oder I-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Bevorzugt ist auch die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere 20 temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P_{rP_r} -Promotor. Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der 25 Nukleinsäuresequenzen ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression 30 negativ beeinflussen und dadurch verringern. So kann eine Abschwächung auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem schwache Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Abschwächung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verringert wird.

35 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem
M/43138

starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

- 5 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promoters, einer geeigneten Shine-Dalgarno-Sequenz mit einer metK-Nukleotidsequenz sowie einem geeigneten Terminationssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, 1993, John Wiley & Sons, Incorporated, New York New York, PCR Methods, Gelfand, David
- 10 H., Innis, Michael A., Sinsky, John J. 1999, Academic Press, Incorporated, California, San Diego, .., PCR Cloning Protocols, Methods in Molecular Biology Ser., Vol. 192, 2nd ed., Humana Press, New Jersey, Totowa. T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene
- 15 Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

- Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem
20 geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg. Elsevier; Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise
25 Phagen, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

- Erfnungsgemäße metK Gene werden beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden
30 exprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvectoren, wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) oder pHs2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvectoren, wie z. B. pCLiK5MCS,
35 SEQ ID NO: 9, oder solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160) oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)) oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des horB-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei

- 5 dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Sirnon et al., Bio/ Technology 1,784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145,69-73 (1994)), Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al. 1991, Journal of Bacteriology 173: 10 4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Andere Plasmidvektoren, wie z. B. pCLiK5MCS integrativ sacB, SEQ ID NO:12, können in gleicher Weise verwendet werden.

- Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch
15 Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Biotechnology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123,343-347 (1994)) beschrieben.

- 20 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zur Produktion von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, kultiviert werden. Eine
25 Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

- 30 Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

- 35 Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure oder Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin, Methanol oder Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure oder Milchsäure.

10

Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Hamstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

15

Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen.

20

Als Schwefelquelle für die Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, können anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

25

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

30

Die erfindungsgemäß eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise M/43138

Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue Zusammensetzung der

- 5 Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1
10 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.

Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu
15 Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.

- Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experiments konstant gehalten oder verändert
20 werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht lässt sich während der Anzucht durch Zugabe von basischen Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder sauren Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B.
25 Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z. B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z. B. Umgebungsluft, in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis
30 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

- Die so erhaltenen, insbesondere L-Methionin enthaltenden, Fermentationsbrühen haben
35 üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.

Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf ≥ 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

5

Die Fermentationsbrühe wird anschließend weiterverarbeitet. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden.

10

Anschließend kann die Fermentationsbrühe mit bekannten Methoden, wie z. B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch 15 Gefriertrocknung, Sprühtrocknung, Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren aufgearbeitet werden.

Es ist aber auch möglich die schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesonder L-Methionin, weiter aufzureinigen. Hierzu wird die produkthaltige Brühe nach dem Abtrennen der 20 Biomasse einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Produkt oder die Verunreinigungen ganz oder teilweise auf dem Chromatographieharz zurückgehalten werden. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze 25 und ihrer wirksamsten Anwendung bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindung(en) kann durch Techniken des Standes 30 der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. 35 Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. M/43138

et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

Die Erfindung wird nun anhand der folgenden nicht-limitierenden Beispiele näher

5 beschrieben:

Figur 1 zeigt die Ergebnisse eines radioaktiven metK Assays, durchgeführt mit Wildtypenzym bzw. C94A Mutante.

10

Beispiel 1

Herstellung des Vektors pCLiK5MCS

Zunächst wurden Ampicillinresistenz und Replikationsursprung des Vektors pBR322 mit den

15 Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2 mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

SEQ ID NO:1

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCCGCCGGCCGGGTGTGAAATACCGCACAG-3'

20

SEQ ID NO:2

5'-TCTAGACTCGAGCGGCCGCCGGCTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTCG-3'

Neben den zu pBR322 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer SEQ

25 ID NO:1 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen SmaI, BamHI, NheI und Ascl und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:2 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, XhoI, NotI und DraI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode von Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,1 kb

30 wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die stumpfen Enden des DNA-Fragmentes wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers miteinander ligiert und der Ligationsansatz nach

35 Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben (1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das M/43138

Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

- Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit
5 (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau
überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK1.

- Ausgehend vom Plasmid pWLT1 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion
wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:3 und SEQ ID NO:4 eine Kanamycin-
10 Resistenzcassette amplifiziert.

SEQ ID NO:3:

5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGA-3'

- 15 SEQ ID NO:4:
5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGCGAAGAACTCCAGCA-3'

Neben den zu pWLT1 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:3 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, SmaI,
20 BamHI, NheI und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:4 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Ascl und NheI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode von Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 1,3 kb wurde mit dem
25 GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und Ascl (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor
30 pCLiK1 wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und Ascl geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,1kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-
35 Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der

Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50 μ g/ml) und Kanamycin (20 μ g/ml) haltigen LB Agar
5 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK2.

10

Der Vektor pCLiK2 wurde mit der Restriktionsendonuklease Drai (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde ein ca. 2,3 kb großes Vektorfragment mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-
15 Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers religiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf
20 Kanamycin (20 μ g/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK3.

25

Ausgehend vom Plasmid pWLQ2 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:6 der Replikationsursprung pHM1519 amplifiziert.

30 SEQ ID NO:5:

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCGCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO:6:

5'-GAGAGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGCCACGC-3'

35

Neben den zu pWLQ2 komplementären Sequenzen, enthalten die Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:6 Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease NotI. Die PCR
M/43138

Reaktion wurde nach Standardmethode von Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,7 kb wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, 5 Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK3 wurde ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease NotI geschnitten und mit alkalischer 10 Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,3kb) mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach 15 Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 20 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5.

?5

Für die Erweiterung von pCLiK5 um eine „multiple cloning site“ (MCS) wurden die beide synthetischen, weitestgehend komplementären Oligonukleotide SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:8, die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Swal, Xhol, AatI, Apal, Asp718, 10 Mlul, Ndel, SpeI, EcoRV, Sall, Clal, BamHI, XbaI und SmaI enthalten, durch gemeinsames erhitzen auf 95°C und langsames abkühlen zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment vereinigt.

SEQ ID NO:7:

5'-TCGAATTAAATCTGAGAGGCCTGACGTCGGGCCGGTACCACCGTCATATGACT
AGTCGGACCTAGGGATATCGTCGACATCGATGCTCTCGCTTAATTAACAATTGGG
ATCCTCTAGACCCGGGATTAAAT-3'

5 SEQ ID NO:8:

5'-GATCATTAAATCCGGGTCTAGAGGATCCAATTGTTAACGAGAAGAGCATC
GATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAACTAGTCATATGACGCGTGGTACCGGGCCCGA
CGTCAGGCCTCTCGAGATTAAAT-3'

- 10 Der Vektor pCLiK5 wurde mit den Restriktionsendonuklease Xhol und BamHI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 5,0 kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem synthetischen Doppelsträngigen DNA-Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA)
- 15 transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.
- 20

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau aus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5MCS.

Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzeraktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS ist als SEQ ID NO:9 aufgeführt.

35 Beispiel 2

Herstellung des Vektors pCLiK5MCS integrativ sacB

Ausgehend vom Plasmid pK19mob (Schäfer et al., Gene 145,69-73(1994)) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:11 das *Bacillus subtilis* *sacB* Gen amplifiziert.

5 SEQ ID NO:10:

5'-GAGAGCGGCCGCGATCCTTTAACCCATCAC-3'

SEQ ID NO:11:

5'-AGGAGCGGCCGCATCGGCATTTCTTTGCG-3'

10

Neben den zu pK19mobsac komplementären Sequenzen, enthalten die Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:11 Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease NotI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode von Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene,

15 La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 1,9 kb wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham

20 Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK5MCS wurde ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease NotI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde ein ungefähr 2,4 kb großes Vektorfragment mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit

25 (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente *E.coli* XL-1Blue

30 (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit
35 (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5MCS integrativ *sacB*.

Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

- 5 Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS integrativ *sacB* ist als SEQ ID NO:12 aufgeführt.

Beispiel 3

Isolierung und Klonierung des *metK* Gens aus *C. glutamicum*

- 10 Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Die folgenden Oligonukleotidprimer wurden ausgehend von der *metK* Sequenz aus Großmann et al. (2000) FEMS Microbiology Letters 193:99-103 synthetisiert:

- 15 SEQ ID NO:13

5'-GAGAGCCCAGGAAGAAGGGCTGCGACCTCCTCAT -3'

und

SEQ ID NO:14

5'-CTCTCACCGCGTCATATGCAGGTGAGGTAACCCCA -3'

20

Nach Standardmethoden von Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, und unter Einsatz der aufgeführten Oligonukleotidprimer, sowie Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde ein DNA Fragment von 1640 Basenpaaren aus der genomischen DNA von *C. glutamicum* amplifiziert.

25

Das Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Mlu* I und *Sma* I (Roche Diagnostics, Mannheim), die über die PCR-Oligonukleotidprimer eingebracht wurden, gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) aus der Agarose

30 aufgereinigt.

Der Vektor pCLiK5MCS, SEQ ID NO:9 wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Sma* I und *Mlu* I gespalten und mit alkalischer Phosphatase I (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Vektor und DNA Fragment wurden mit T4 DNA

35 Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg) ligiert und nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben, in *E.coli* XL-1Blue (Fa. Stratagene) transformiert.

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) 5 aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS/metKwt ist als SEQ ID NO:15 aufgeführt.

Beispiel 4

10 Mutagenese des metK Gens aus C. glutamicum

Die gerichtete Mutagenese des metK Gens aus C. glutamicum wurde mit dem QuickChange Kit (Fa. Stratagene) und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Mutagenese wurde im Plasmid pCLiK5MCS/metKwt, SEQ ID NO:15 durchgeführt. Für den Austausch von 15 Cystein 94 aus SEQ ID NO: 16 nach Alanin 94 wurden folgende Oligonukleotidprimer synthetisiert:

SEQ ID NO:17

5'-GATTCGACGGACGCACCGCTGGCGTCTCAGTATCCATC -3'

20 und

SEQ ID NO:18

5'-GATGGATACTGAGACGCCAGCGGTGCGTCCGTCGAATC -3'

Der Einsatz dieser Oligonukleotidprimer führt in SEQ ID NO:15 zu einem Austausch der 25 Nukleotide in Position 1056 (von C nach G) und 1057 (von A nach C). Der resultierende Aminosäureaustausch Cys94Ala im metK Gen wurde nach Transformation und Plasmidpräparation durch Sequenzierungsreaktionen bestätigt. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pCLiK5MCS/metKC94A und ist als SEQ ID NO:19 aufgeführt.

10

Beispiel 5

SAM Synthetase (metK) Assay

C. glutamicum Stämme, die entweder mit dem Plasmid pCLiK5MCS/metKwt, SEQ ID NO: 15, oder mit dem Plasmid pCLiK5MCS/metKC94A, SEQ ID NO: 19 transformiert wurden, wurden in BHI/Glucose-Medium (37 g/l Brain Heart Infusion Fertigmedium, Fa. Difco, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 4% Glucose) bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 20 angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet wurde mit kalter physiologischer Kochsalzlösung

gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden 0,25 g feuchtes Zellpellet mit 1 mL Aufschlußpuffer (50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT) bei 4°C resuspendiert. In einem Ribolyser der Fa. Hybaid und in blauen Ribolyserröhrchen der Fa. Hybaid und bei einer Rotationseinstellung von 6,0 wurde die Bakteriensuspension dreimal für 5 jeweils 30 Sekunden lysiert. Das Lysat wurde durch 45minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Eppendorfzentrifuge geklärt und der Überstand 1:10 mit Wasser verdünnt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford, M. M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

Die enzymatische Aktivität der SAM Synthase wurde nach Markham, G.D. et al. (1983)
10 Methods in Enzymology 94: 219-222, mit folgenden Modifikationen bestimmt.

Reaktionsansätze von 100 µl mit 100 mM Tris pH 8,0, 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 1,2 mM L-Methionin, 10 mM ATP, 1 µl ³⁵S-L-Methionin, entsprechend 15,15 µCi (Amersham SJ204, spez. Aktivität 1 Ci/µmol) und H₂O ad 100 µl wurden mit 100 µg der jeweiligen Proteinlysate 15 gestartet und bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten wurden 10 µl Aliquots des Reaktionsansatzes entnommen und auf Eis mit 20 µl 50 mM EDTA gestoppt.

30 µl der abgestoppten Reaktion wurden auf Phosphocellulose Filtereinheiten (Fa. Pierce, 20 Nr. 29520) gegeben und bei 6.000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge für 1 Minute abzentrifugiert. Der Filter wurde zweimal mit 500 µl 75 mM Phosphorsäure gewaschen und dann in ein Zählröhrchen mit Szintillationsflüssigkeit gegeben. Die Radioaktivität des gebildeten S-Adenosylmethionins wird in einem Szintillationszähler (Fa. Beckman) bestimmt.
25 Die Messergebnisse sind in beiliegender Figur 1 dargestellt.

Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität des radioaktiven L-Methioninssowie der eingesetzten Proteinmenge lässt sich die Rate der S-Adenosylmethionin-Bildung aus der Zunahme der eingebauten Radioaktivität pro Zeiteinheit bestimmen. Ihre Einheit lautet µmol 30 S-Adenosylmethionin/min*mg Protein. Diese Rate kann zwischen Wildtypenzym und Mutantenerzym verglichen werden.

Beispiel 6

Bestimmung des zellulären S-Adenosylmethionin Titers in C. glutamicum

Zur Bestimmung der zellulären Titer von S-Adenosylmethionin in C. glutamicum Stämmen, die entweder mit pCLiK5MCS/metKwt (SEQ ID NO:15), oder pCLiK5MCS/metKC94A (SEQ 35 M/43138

ID NO:19) transformiert wurden, wurde wie folgt verfahren. Ein wie in Beispiel 5 erhaltenes Zellpellet, das mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen wurde, wurde mit Trichloressigsäure (200 µl TCA pro 0,1 g feuchtes Pellet) resuspendiert. Nach 5 Minuten auf Eis wurde die Suspension bei 4°C und 13.000 rpm für 5 min in einer Eppendorfzentrifuge geklärt. Der S-Adenosylmethionin Gehalt im Überstand wurde mittels HPLC bestimmt (Ionospher 5C Kationenaustauschersäule, 10 µl Injektionsvolumen; Laufmittel: 70% vol/vol 0,2 M Ammoniumformiat pH 4,0 30% vol/vol Methanol; UV-Detektion 260 nm; 40°C; Retentionszeit 8,5 Min.).

10 Tab.1. S-Adenosylmethionin-Titer

	mg/l
ATCC 13032 + metK	73,94
ATCC 13032 + metK C94A	47,36

Beispiel 7

15 Austausch des metK wt Gens in *C. glutamicum* durch metK C94A

Für den allelischen Austausch des metK Wildtypgens in *C. glutamicum* KFCC10065 durch die Mutante metK C94A wurde zunächst die metK C94A Sequenz aus SEQ ID NO:19 in pCLiK5MCS integrativ sacB (SEQ ID NO:12) kloniert. Dazu wurde das Plasmid pCLiK5MCS/metKC94A (SEQ ID NO:19) mit den Restriktionsendonukleasen Bgl II und Xho I (Fa. NEB, Schwalbach) gespalten. Das erhaltene Fragment der Größe 1962 Basenpaare wurde wie in Beispiel 3 beschrieben, gereinigt. Der Vektor pCLiK5MCS integrativ sacB wurde ebenfalls mit Bgl II und Xhol gespalten und wie in Beispiel 3 beschrieben, aufgereinigt. Vektor und Fragment wurden wie in Beispiel 3 beschrieben, ligiert, in *E.coli* XL-1Blue transformiert. Das Plasmid wurden gereinigt und nach Sequenzierung bestätigt. Das erhaltene Plasmid pCLiK5MCS integrativ sacB/metKC94A ist als SEQ ID NO:20 aufgeführt.

Das Plasmid pCLiK5MCS integrativ sacB/metKC94A wurde in *C. glutamicum* KFCC10065 mittels Elektroporation wie bei Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 beschrieben, transformiert. Modifikationen des Protokolls sind in DE 10046870 beschrieben. Die chromosomal Anordnung des metK-Lokus einzelner Transformanten wurde mit Standardmethoden durch Southernblot und Hybridisierung wie in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben, überprüft.

- Dadurch wurde sichergestellt, daß es sich bei den Transformanten um solche handelt, die das transformierte Plasmid durch homologe Rekombination am metK-Lokus integriert haben. Nach Wachstum solcher Kolonien über Nacht in Medien, die kein Antibiotikum enthalten, werden solche Transformanten dann auf ein Saccharose-CM-Agarmedium (10%
5 Saccharose) ausplattiert und bei 30°C für 24 Stunden inkubiert.

Da das im Vektor pCLiK5MCS integrativ sacB/metKC94A enthaltende sacB Gen Saccharose in ein toxisches Produkt umwandelt, können nur solche Kolonien anwachsen, die das sacB Gen durch einen zweiten homologen Rekombinationsschritt zwischen dem Wildtyp metK
10 Gen und dem mutierten metKC94A Gen deletiert haben. Während der homologen Rekombination kann entweder das Wildtyp Gen, oder das mutierte Gen zusammen mit dem sacB Gen deletiert werden. Wenn das sacB Gen zusammen mit dem Wildtyp Gen entfernt wird, resultiert eine mutierte Transformante.
15 Anwachsende Kolonien wurden gepickt, ihre genomische DNA präpariert und das metK Gen mit zwei Methoden analysiert. Zum einen wurde der Austausch von zwei Nukleotiden, wie in Beispiel 4 beschrieben, genutzt. Mit Hilfe eines spezifischen PCR-Oligonukleotidprimers, der an seinem 3'-Ende zwischen beiden Allelen differenzieren kann und eines zweiten metK-spezifischen Oligonukleotidprimers konnten diagnostische PCR-Fragmente generiert
20 werden. Zum anderen wurden bei etwa 100 Transformanten der metK-Lokus nach PCR-Amplifikation mit PCR-Oligonukleotidprimern, die stromauf, bzw. stromab der Mutation binden, sequenziert. Es wurden mehrere mutierte metK Klone erhalten. Ein solcher Klon wurde mit KFCC10065metKC94A bezeichnet. Die Aminosäuresequenz der Mutante C94A entspricht SEQ ID NO:22.

25

Beispiel 8

Herstellung von Methionin mit dem Stamm KFCC10065metKC94A

- 30 Der in Beispiel 6 hergestellte Stamm KFCC10065metKC94A wurde auf einer Agar Platte mit BHI-Medium (Difco) für 2 Tage bei 30°C angezogen. Die aufgewachsenen Zellen wurden in Saline von der Agarplatte suspendiert und mit einer OD 600nm von 1,5 in das Medium II überführt. Das Medium II wurde wie folgt zusammengesetzt.

35 Medium IIA

0.6g/l	KH ₂ PO ₄
0.4g/l	MgSO ₄ ·7H ₂ O

25g/l (NH₄)₂SO₄

40g/l Rohzucker

60g/l Melasse

Das so angesetzte Medium wurde mit NH₄OH auf pH 7,8 eingestellt und bei 120°C für 30

5 min sterilisiert.

Medium IIB:

0.3mg/l Thiamin*HCl

1mg/l Biotin

10 2mg/l FeSO₄

2mg/l MnSO₄

0.1mg/l Vit.B12

Medium IIB wurden separat angesetzt, durch Filtration sterilisiert und dem Medium IIA

15 zugefügt. Beide Bestandteile IIa und IIB ergeben zusammen das Medium II.

Vom Medium II (= IIA+B) wurden 10ml in einem 100ml Erlenmyerkolben mit 0,5g sterilisiertem CaCO₃ mit Zellen des oben genannten Stamms versetzt, für 72h auf einem Orbitalschüttler mit 200 Upm bei 30°C inkubiert.

20

Gebildetes Methionin in der Kulturbrühe wurde mit Hilfe der Aminosäuresäure-Bestimmungsmethode von Agilent auf einer Agilent 1100 Series LC System HPLC bestimmt. Eine Vorsäulenderivatisierung mit Ortho-Phthalaldehyd erlaubt die Quantifizierung der gebildeten Aminosäuren, die Auf trennung des Aminosäuregemisches findet auf einer Hypersil

25 AA-Säule (Agilent) statt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung wenigstens einer schwefelhaltigen Feinchemikalie, welches folgende Schritte umfasst:
 - 5 a) Fermentation einer die gewünschte schwefelhaltige Feinchemikalie produzierenden coryneformen Bakterienkultur, wobei in den coryneformen Bakterien zumindest eine Nukleotidsequenz exprimiert wird, welche für ein Protein mit veränderter S-Adenosylmethionin Synthase (metK) -Aktivität kodiert;
 - b) Anreicherung der schwefelhaltigen Feinchemikalie im Medium und/oder in den 10 Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der schwefelhaltigen Feinchemikalie.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die schwefelhaltige Feinchemikalie L-Methionin umfasst.
 - 15 3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man mutierte coryneforme Bakterien mit, im Vergleich zum nichtmutierten Wildtyp, verringelter metK Aktivität einsetzt.
 - 20 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das mutierte coryneforme Bakterium außerdem eine, im Vergleich zum nichtmutierten Wildtyp, verbesserte metY Aktivität und/oder eine gesteigerte L-Methionin-Menge aufweist.
 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die metK-kodierende Sequenz eine kodierende Nukleotidsequenz ist, welche für ein Protein mit verringrigerter metK-Aktivität kodiert, in welchem wenigstens ein Cysteinrest des Wildtypproteins substituiert ist.
 - 25 6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die metK-kodierende Sequenz eine kodierende Nukleotidsequenz ist, die für ein Protein mit metK-Aktivität kodiert, welches folgende Aminosäureteilsequenz aufweist:

G(F/Y)(D/S)X¹X²(S/T)X³(G/A)V

- 30 35 worin
X¹ und X² unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure stehen;

und

X³ für eine von Cys verschiedene Aminosäure steht.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die metK-kodierende Sequenz für ein Protein mit metK-Aktivität kodiert, wobei das Protein eine Aminosäuresequenz von Val1 bis Ala407 gemäß SEQ ID NO: 22 oder eine dazu homologe Aminosäuresequenz, welche für ein Protein mit funktionaler Äquivalenz steht, umfasst.
- 10 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die kodierende metK-Sequenz eine in coryneformen Bakterien replizierbare oder eine stabil in das Chromosom integrierte DNA oder eine RNA ist.
- 15 9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man
 - a) einen mit einem Plasmidvektor transformierten Bakterienstamm einsetzt, der wenigstens eine Kopie der mutierten metK-Sequenz unter der Kontrolle regulativer Sequenzen trägt, oder
 - b) einen Stamm einsetzt, in dem die mutierte metK-Sequenz in das Chromosom des Bakteriums integriert wurde.
- 20 10. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man Bakterien fermentiert, in denen zusätzlich wenigstens ein weiteres Gen des Biosyntheseweges der gewünschten schwefelhaltigen Feinchemikalie verstärkt ist.
- 25 11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man Bakterien fermentiert, in denen wenigstens ein Stoffwechselweg zumindest teilweise ausgeschaltet sind, der die Bildung der gewünschten schwefelhaltigen Feinchemikalie verringert.
- 30 12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man coryneforme Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines der Gene, ausgewählt unter
 - a) dem für eine Aspartatkinase kodierenden Gen lysC,
 - b) dem für eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase kodierenden Gen asd
 - c) dem für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierenden Gen gap.

- d) dem für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierenden Gen pgk,
e) dem für die Pyruvat Carboxylase kodierenden Gen pyc,
f) dem für die Triosephosphat Isomerase kodierenden Gen tpi,
g) dem für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierenden Gen metA,
5 h) dem für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierenden Gen metB,
i) dem für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierenden Gen metC,
j) dem für die Methionin-Synthase kodierenden Gen metH
k) dem für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierenden Gen glyA,
l) dem für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase kodierenden Gen metY,
10 m) dem für die Metylentetrahydrofolat-Reduktase kodierenden Gens metF Gen,
n) dem für die Phosphoserin-Aminotransferase kodierenden Gens serC Gen, das
für die kodiert,
o) dem für die Phosphoserin-Phosphatase kodierenden Gens serB,
p) dem für die Serin Acetyl-Transferase kodierenden Gens cysE,
15 q) dem für die Cystein-Synthase kodierenden Gen cysK, und
r) dem für die Homoserin-Dehydrogenase kodierenden Gens hom
überexprimiert ist; und/oder
in denen gleichzeitig wenigstens eines dieser Gene so mutiert ist, dass das
korrespondierende Protein verglichen mit dem nicht mutierten Protein in geringerem
20 Maße oder nicht mehr durch einen Stoffwechselmetaboliten in seiner Aktivität
beeinflusst wird, oder dass dessen spezifische Aktivität gesteigert wird
13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man coryneforme
Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines der Gene, ausgewählt
25 unter
a) dem für die Homoserine-Kinase kodierenden Gen thrB,
b) dem für die Threonin Dehydratase kodierenden Gen ilvA,
c) dem für die Threonin Synthase kodierenden Gen thrC
d) dem für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierenden Gen ddh
30 e) dem für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierenden Gen pck,
f) dem für die Glucose-6-Phosphat-6-Isomerase kodierenden Gen pgi,
g) dem für die Pyruvat-Oxidase kodierenden Gen poxB,
h) dem für die Dihydrodipicolinat Synthase kodiernden Gen dapA,
i) dem für die Dihydrodipicolinat Reduktase kodiernden Gen dapB; oder
35 j) dem für die Diaminopicolinat Decarboxylase kodiernden Gen lysA

abschwächt ist; und /oder

wobei man coryneforme Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines dieser Gene so mutiert ist, so dass die enzymatische Aktivität des korrespondierenden Proteins teilweise oder vollständig verringert wird.

5

14. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.

10

15. Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, welches folgende Schritte umfasst

a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus gemäß der Definition in einem der vorhergehenden Ansprüche in einem Fermentationsmedium;

b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe;

15

c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und

d) Trocknung der gemäß b) und/oder c) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

20

16. Isoliertes Polynukleotid gemäß der Definition in einem der Ansprüche 5 bis 7, das für ein Polypeptid mit verringelter metK-Aktivität kodiert.

17. MetK-Mutante mit verringelter Aktivität, welches von einem Polynukleotid nach Anspruch 16 kodiert wird.

25

18. Rekombinante coryneforme Bakterien, die ein mutiertes metK Gen, umfassend eine Polynukleotidsequenz gemäß der Definition in einem der Ansprüche 5 bis 7, exprimieren.

30

19. Rekombinante coryneforme Bakterien nach Anspruch 18 welche das metK-Wildtypenzym nicht mehr exprimieren.

35

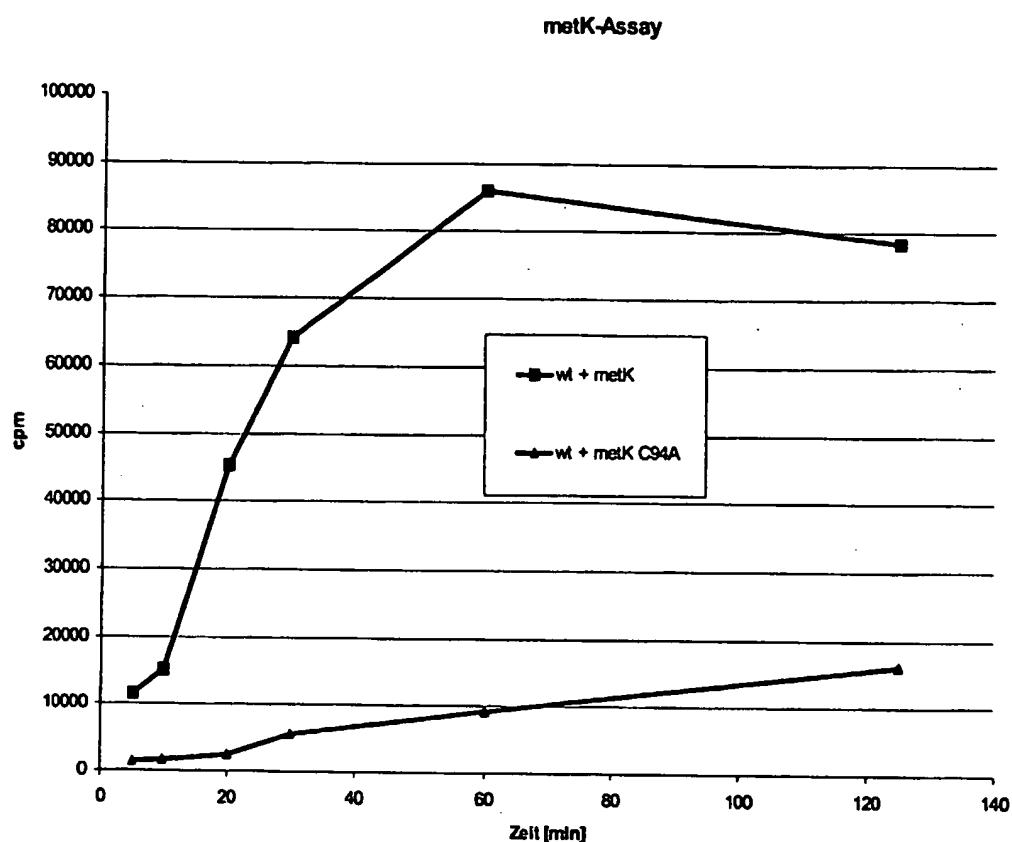
20. Rekombinante coryneforme Bakterien gemäß Anspruch 19, welche im Vergleich zum korrespondierenden Wildtypstamm wenigstens eines der folgenden Merkmale:

a) geringeren intrazellulären S-Adenosylmethionin Titer

- b) geringere intrazelluläre S-Adenosylmethionin Synthase Konzentration, oder
- c) geringere Aktivität der S-Adenosylmethionin Synthase, bestimmt anhand der S-Adenosylmethionin Bildungsrate;
und zusätzlich gegebenenfalls wenigstens eines der folgenden Merkmale:
 - 5 d) verbesserte metY Aktivität, oder
 - e) gesteigerte L-MethioninMenge.
aufweisen.

21. Expressionskonstrukt, enthaltend unter der Kontrolle einer regulativen
10 Nukleotidsequenz die kodierende Sequenz für eine metK-Mutante gemäß der
Definition in einem der Ansprüche 5 bis 7.

1/1

Fig.1

1

SEQUENCE LISTING

5 <110> BASF Aktiengesellschaft
10 <120> METK
<130> M/43138
15 <160> 23
20 <170> PatentIn version 3.1
25 <210> 1
<211> 52
<212> DNA
30 <213> Künstliche Sequenz
35 <400> 1
cccgggatcc gctagcggcg cgccggccgg cccggtgtga aataccgcac ag 52
40 <210> 2
<211> 53
<212> DNA
45 <213> Künstliche Sequenz
50 <400> 2
tcttagactcg agcggccgca gccggccttt aaattgaaga ccaaagggcc tcg 53
<210> 3
55 <211> 47
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
60

5 <400> 3
gagatctaga cccggggatc cgctagcggt ctgctaaagg aagcgga 47

10 <210> 4
10 <211> 38
10 <212> DNA
10 <213> Künstliche Sequenz

15 <400> 4
15 gagaggcgcg ccgcgtacgt gggcgaagaa ctccagca 38

20 <210> 5
20 <211> 34
25 <212> DNA
25 <213> Künstliche Sequenz

30 <400> 5
30 gagagggcgcc ccgcgcggaa tccccgttcg tgaa 34

35 <210> 6
35 <211> 34
40 <212> DNA
40 <213> Künstliche Sequenz

45 <400> 6
45 gagagggcgcc ccgcgtcaagt cggtaagcc acgc 34

50 <210> 7
50 <211> 140
50 <212> DNA
55 <213> Künstliche Sequenz

<400> 7

tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggccggta ccacgcgtca tatgactagt 60
tcggacctag ggatatcgatc gacatcgatg ctcttctgcg ttaattaaca attgggatcc 120
5 tctagacccg ggatttaaat 140

<210> 8
10 <211> 140
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
15

<400> 8
20 gatcatttaa atcccggtc tagaggatcc caattgttaa ttaacgcaga agagcatcga 60
tgtcgacgt atcccttaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gcccgcgtc 120
aggcctctcg agatttaaat 140

25 <210> 9
<211> 5091
30 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

35 <400> 9
40 tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtac cacgcgtcat atgactagtt 60
cgacccctagg gatatcgatcg acatcgatgc tcttctgcgt taattaacaa ttgggatcct 120
ctagacccgg gatttaaatc gctagcgggc tgctaaagga agcggAACAC gtagaaAGCC 180
agtccgcaga aacggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat ctggacaagg 240
45 gaaaacgcaa gcgcaaAGAG aaAGCAGGTA GCTTGCAGTG GGTACATG GCGATAGCTA 300
gactgggcgg ttttatggac agcaagcgaa ccggAAATTGc cagctggggc gcccctgtgt 360
50 aaggTTGGGA AGCCCTGCAA AGTAAACTGG ATGGCTTCT TGCCGCCAAG GATCTGATGG 420
cgcaggggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcat gattgaacaa 480
gatggattgc acgcagggttc tccggccgtc tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg 540
55 gcacaacaga caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc 600
ccggTTCTTT TTGTCAGAC CGACCTGTCG GGTGCCCTGA ATGAACTGCA GGACGAGGCA 660
gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc 720

	actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca	780
5	tctcaccttg ctccctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat	840
	acgcttgatec cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca	900
	cgtactcggta tggaagccgg tcttgcgtat caggatgatec tggacgaaga gcatcagggg	960
10	ctcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcga tgccccacgg cgaggatctc	1020
	gtcgtgaccc atggcgatgc ctgcttgcgg aatatcatgg tgaaaaatgg ccgcctttct	1080
15	ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttgct	1140
	acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatggctg accgcttcct cgtcgtttac	1200
	ggtatcgccg ctccccattc gcagcgcatc gccttctatc gccttcttga cgagttttc	1260
20	tgagcgggac tctgggttc gaaatgaccg accaagcgcac gccaaacctg ccatcacag	1320
	atttcgattc caccggcggc ttctatgaaa ggttggctt cggaaatcggtt ttccgggacg	1380
25	ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcattgtggta gttttcgcc cacgcttagcg	1440
	gcgcgcggc cggccgggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac	1500
	aggcgctttt ccgccttcctc gctcaactgac tcgctgcgt cggtcgttgc gctgcggcga	1560
30	gcggtatcag ctcactcaaa ggccgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgc	1620
	ggaaagaaca tggagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaaa ggccgcgtt	1680
35	ctggcgcccccc tccataggct ccgcggccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt	1740
	cagagggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccccc tggaagctcc	1800
	ctcgtgcgtt ctcctgttcc gaccctgcgg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct	1860
40	tcgggaagcg tggcgcttcc tcatacgatca cgctgttaggt atctcagttc ggtgttaggtc	1920
	gttcgcgttcca agctggctg tggcacgaa ccccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta	1980
45	tccggtaact atcgcttga gtccaaacccg gtaagacacg acttacgcac actggcagca	2040
	gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttttgttgc	2100
	tggtggcccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag	2160
50	ccagttaccc tcggaaaaag agttggtagc tcttgcgttcc gcaaaacaaac caccgttgtt	2220
	agcgggtgtt tttttgttttcaagcagcag attacgcgcgaa gaaaaaaaaagg atctcaagaa	2280
55	gatccttgcgttca tctttctac ggggtctgac gctcagtggta acgaaaactc acgttaaggg	2340
	attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacccataga tcctttaaa ggccggccgc	2400
	ggccgcgcaaa agtccccgtt cgtaaaaatt ttcgtgcgcgtt gttttttcc gccaaaaact	2460

	ttaacgaacg ttcgttataa tggtgtcatg accttcacga cgaagtacta aaattggccc	2520
	gaatcatcg ctatggatct ctctgatgtc gcgcggagt ccgacgcgt cgatgtgcc	2580
5	gtcgatttaa aaacggtgat cggattttc cgagctctcg atacgacgga cgcgccagca	2640
	tcacgagact gggccagtgc cgcgagcgc ac tagaaactc tcgtggcgg a tttgaggag	2700
10	ctggctgacg agctgcgtgc tcggccagcg ccaggaggac gcacagtgt ggaggatgca	2760
	atcagttgcg cctactgcgg tggctgatt cctccccgc ctgaccgcg aggacggcgc	2820
	gcaaaaatatt gctcagatgc gtgtcgtgcc geagccagcc gcgagcgcgc caacaaacgc	2880
15	cacgcccagg agctggaggc ggctaggcgt caaatggcgc tggaaagtgcg tcccccgagc	2940
	gaaatttgg ccatggtcgt cacagagctg gaagcggcag cgagaattat cgcgatcgtg	3000
20	gcgggtccccg caggcatgac aaacatcgta aatgccgcgt ttctgtgtgcc gtggccgccc	3060
	aggacgtgtc agcgcgcaca ccacctgcac cgaatcgca gcagcgtcgc gcgtcgaaaa	3120
	agcgcacagg cggcaagaag cgataagctg cacgaatacc tgaaaaatgt tgaacgcccc	3180
25	gtgagcggta actcacaggg cgtcggctaa cccccagtcc aaacctggga gaaagcgctc	3240
	aaaaatgact ctagcggatt cacgagacat tgacacacccg gcctggaaat ttcccgctga	3300
30	tctgttcgac acccatcccc agctcgcgt gcgcacgt ggctggacga gcaagaccg	3360
	ccgcgaattc ctcgctcacc tggcagaga aaatttccag ggcagcaaga cccgcgactt	3420
	cgccagcgct tggatcaaag acccggacac ggagaaacac agccgaagtt ataccgagtt	3480
35	ggttcaaat cgcttccccg gtgcaggat gttgctctga cgacgcgcga gcacgcagcc	3540
	gtgcttgc tggacattga tgtgccgagc caccaggccg gccccaaat cgacgcacgt	3600
40	aaccccgagg tctacgcgtat ttggagcgc tggcacgccc tggaaaaagc gccagcttgg	3660
	atcggcgtga atccactgag cggaaatgc cagctcatct ggctcattga tccgggttat	3720
	gccgcagcag gcatgagcag cccgaatatg cgcctgctgg ctgcaacgc acgaggaaatg	3780
45	acccgcgttt tcggcgtga ccaggcttt tcacataggc tgagccgtgg ccactgcact	3840
	ctccgcacat cccagccgtat cgcctggcat gcccagcaca atcgcgtggat tcgcctagct	3900
50	gatcttatgg aggttgcgtcg catgatctca ggcacagaaa aacctaaaaa acgctatgag	3960
	caggagttt ctagcggacg ggcacgtatc gaagcggcaa gaaaagccac tgccggaaagca	4020
	aaagcacttgc ccaacgttgc agcaaggctg cgcagcgcgc ctgaaagcgtc tggagagctg	4080
55	atcgcacggcg tccgtgtctt ctggactgtc ccaggccgtg ccgcctgtga tgagacggct	4140
	tttcgcacg ctttgcgtgtt gggataccag taaaagcgg ctggtgagcg cctaaaagac	4200
	accaagggtc atcgagccta cgagcgtgcc tacaccgtcg ctcaaggcggt cggaggaggc	4260

cgtgaggcctg atctgccgcc ggactgtgac cgccagacgg attggccgcg acgtgtgcgc 4320
5 ggctacgtcg ctaaaggcca gccagtcgtc cctgctcgtc agacagagac gcagagccag 4380
ccgaggcgaa aagctctggc cactatggga agacgtggcg gtaaaaaggc cgcagaacgc 4440
tggaaagacc caaacagtga gtacgcccga gcacagcgag aaaaacttagc taagtccagt 4500
10 caacgacaag ctaggaaagc taaaggaaat cgcttgacca ttgcaggttg gtttatgact 4560
gttgagggag agactggctc gtggccgaca atcaatgaag ctatgtctga atttagcgtg 4620
15 tcacgtcaga ccgtaatag agcacttaag gtctgcgggc attgaacttc cacgaggacg 4680
ccgaaagctt cccagtaaat gtgccatctc taggcagaa aacggttccc ccgtagggtc 4740
tctctttgg cttcccttctt aggtcgggct gattgtctt gaagctctt aggggggctc 4800
20 acaccatagg cagataacgt tccccaccgg ctgcctcgt aagcgcacaa ggactgctcc 4860
caaagatctt caaagccact gccgcgactg cttcgcgaa gccttgcddd gcggaaattt 4920
25 cttccaccga gttcgtgcac acccctatgc caagcttctt tcaccctaaa ttcgagagat 4980
tggattctta ccgtggaaat tttcgcaaa aatcgcccc tgcgtccct tgacgacgttg 5040
gcgtcggtgc cgctggttgc gcttggctt accgacttga tcagcggccg c 5091
30 <210> 10
<211> 33
35 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
40 <400> 10
gagagcggcc gccgatcctt tttaacccat cac 33
45 <210> 11
<211> 32
50 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
55 <400> 11
aggagcggcc gccatcgca ttttcttttgc cg 32

<210> 12

<211> 4323

5 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

10

<400> 12

tcgagaggcc tgacgtcgaa cccggatcca cgcgtcatat gactagttcg gacctaggga 60

15

tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatccctt agacccggga 120

tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cgaaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 180

cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tggctatct ggacaaggaa aaacgcaagc 240

20

gcaaagagaa agcaggttagc ttgcagtggg cttacatggc gatacgtaga ctggcggtt 300

ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag 360

25

ccctgcaaag taaaactggat ggcttcttg cgcggaaagg tctgtatggcg caggggatca 420

agatctgatc aagagacagg atgaggatcg ttgcgtatga ttgaacaaga tggattgcac 480

gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcgct atgactggc acaacagaca 540

30

atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc agggggcccc ggttctttt 600

gtcaagaccc acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcage gcggctatcg 660

35

tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgc gctgtgtcg acgttgtcac tgaagcggga 720

agggactggc tgcttattggg cgaagtgcgg gggcaggatc tcctgtatc tcaccttgct 780

cctgcccaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgcattcg 840

40

gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgatcg agcgagcactg tactcgatg 900

gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 960

45

gaactgttcg ccaggctcaa ggccgcgcatg cccgacggcg aggtatctcg cgtgaccat 1020

ggcgatgcct gcttgcgaa tatcatggg gaaaatggcc gctttctgg attcatcgac 1080

tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac cctgtatatt 1140

50

gctgaagagc ttggccggcga atgggctgac cgcttctcg tgctttacgg tatcgccgt 1200

cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc 1260

55

tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttgcattcca 1320

ccgcccctt ctagaaagg ttggcttcg gaatcgaaaa ccggacgcg ggctggatga 1380

tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcggccca cgctagcggc gcgcggccg 1440

	gccccgtgtg aaataccgca cagatgcgtc aggagaaaaat accgcattcag gcgctttcc	1500
	gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttggc tgcggcgagc ggtatcagct	1560
5	cactcaaagg cggttaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	1620
	ttagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgc ggcgttttc	1680
10	cataggttcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	1740
	aacccgacag gactataaag ataccaggcg ttccccctg gaagctcccct cgtgcgttct	1800
	cctgttccga ccctgcccgtt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaaagcgtg	1860
15	gcgctttctc atagctcactc ctgttaggtat ctgcgttccgg tgtaggttgt tgcgttccaag	1920
	ctggggctgtg tgcacgaacc ccccgttcaag cccgaccgct gcgccttatac cggttaactat	1980
20	cgtcttgagt ccaaccggta aagacacgac ttatgccac tggcagcagc cactggtaac	2040
	aggattagca gagcgaggta tgtagggcgt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac	2100
	tacggctaca ctagaaggac agtatttttgtt atctgcgttctc tgctgaagcc agttacctc	2160
25	ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgcgttggtag cggtgggttt	2220
	tttggtttgc a cagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tccctttgatc	2280
30	ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC gaaaactcac gttaagggtat tttggtcatg	2340
	agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgcacatcg	2400
	cattttcttt tgcgttttta tttgttaact gttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct	2460
35	ttgacaacag atgtttctt gcctttgatg ttcagcagga agctcgccgc aaacgtttagt	2520
	tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc atatagcttgc taatcacgac attgtttctt	2580
40	ttcgcttgag gtacagcgaa gtgtgagtaa gtAAAGGTTA catcgtagg atcaagatcc	2640
	attttaaca caaggccagt tttgttcage ggcttgcgttggccatgtaa agaattagaa	2700
	acataaccaa gcatgtaaat atcgtagac gtaatgccgt caatcgatcat ttttgcgttcc	2760
45	cgggagtcag tgaacaggta ccatttgcgg ttcatTTAA agacgttgcgc gcgttcaatt	2820
	tcatctgtta ctgtgttgcgatc tgcaatcagc ggtttcatca ctttttcag tttgtatca	2880
50	tcgttttagct caatcatacc gagagcgccg tttgttaact cagccgttgcg tttttatcg	2940
	ctttgcagaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgtatc tgcttttgcc atagtatgt	3000
	ttgtttaata aagattcttc gccttggtag ccatttcag ttccagttgtt tgcttcaaat	3060
55	actaagtatt tttttttttt atcttctacg tagtggggat ctctcagcgt atgggtgtcg	3120
	cctgagctgt agtgccttc atcgatgaac tgctgtacat tttgtatacg tttccgtca	3180
	ccgtcaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgcgttgc tcaaagagct gtctgtatgt	3240

	gatacgttaa cttgtgcagt tgcgttgtt tgccgtt aatgtttacc ggagaaatca	3300
5	gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaatgtgg ctgaacctga ccattctgt	3360
	gtttggcttt ttaggataga atcatttgc tcgaatttgt cgctgtctt aaagacgcgg	3420
	ccagcgaaaa tccagctgtc aatagaagtt tcgcccactt ttgtatagaa catgtaaatc	3480
10	gatgtgtcat ccgcattttt aggatctccg gctaatgcaa agacgatgtg gtagccgtga	3540
	tagttgcga cagtgcgcgc acgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct	3600
15	tttgcagaag agatattttt aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atattttca	3660
	ttttttgct gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggaa aatgccgtat	3720
	tttccttat atggctttt gttcgtttct ttgcacaacg cttgagttgc gcctcctgcc	3780
20	agcagtgcgg tagtaaaggt taatactgtt gttgttttgc caaactttt gatgttcatc	3840
	gttcatgtct cttttttat gtactgtgtt agcggctgc ttcttccagc cttcctgttt	3900
25	gaagatggca agttagttac gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc	3960
	caaagtatac actttgcctt ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac	4020
	ccgcgcgatt tactttcga ctttcatttca tttagactctc gttggattt caactggct	4080
30	atttcctct tttgtttgtt agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga	4140
	actaaaaaat ctatctgttt ctttcatc tctgtatattt ttatagtttc ttttgcattgg	4200
35	gcataaaagtt gccttttaa tcacaattca gaaaatatca taatatctca ttttactaaa	4260
	taatagtgaa cggcaggtat atgtgtatggg ttaaaaagga tcggcggccg ctcgattttaa	4320
	atc	4323
40	<210> 13	
	<211> 34	
45	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
50	<400> 13	
	gagagccccgg gaagaagggc tgcgacccctcc tcat	34
55	<210> 14	
	<211> 34	

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

5

<400> 14

ctctcacgcg tcataatgcag gtgaggtaac ccca

34

10

<210> 15

<211> 6631

15 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

20

<400> 15

cgcgtcatat gcaggtgagg taacccaaa agaggtaaaa cccgcgccac cgactttca 60

25

ggagcgggga cgcgggttt tgccatgaat ccgaagatac tacatcagat ttttaggca 120

acttgagggc tgcgcgaagt tcatcaacgc ggtcgatagc ctcccaagga aggtccaaat 180

cagtgcgacc aaagtggccg taggcagcag tgcagcgta gatcgacga agcagatcaa 240

30

gctcacggat aattgctgt ggacgcaggt caaagacctc caacacggca gcctgaatct 300

gctcgtcgct caggccttcc ttgttggtgt caaaggttcc aacgtaaagt ccgactggct 360

35

ttgcgcgtcc aatggcgtat gcaacctgaa cttcagcgcg atcagcaagg cctgctgcca 420

cgatgttctt tgctacccaa cgcattggcg atgcagcaga ggggtccacc ttgcttgat 480

ccttaccggaa gaatgctcca ccaccatggc gagccatgccc accgttagtta tccacgatga 540

40

tcttcgggcc ggtcagaccc gcatcacca tggggccacc cagaatgaag gaaacctgaag 600

ggttgatcaa cacgggtgatc tcaccgggtt ccagatcctc aatgcctgctg tctttgatta 660

45

cccaatcaat gacgtgttcg cgcagttggg ttccaaacca tgcacggtca acttctgggt 720

cgtgctgggt ggagatgaca acggtatcca ggtggctagg ggggtcttgc gcatcgatg 780

cgaagggtgac ctgggtttt ccgtctggac gcagggtgagg aacgtgccc tctttacgaa 840

50

cctgggtcag acgacgtgac agtcgggtcg ccaacgcgtt aggaagagggc atgtactctt 900

cggtttcgtt ggtggcgtat ccgaacatca ggcctggtc gccagcacct ggcgggtcg 960

55

cttcttcaac gtcggccgtt gtgcgggctt cgtcgagtt atccacgccc tcagcgattt 1020

cctgggactg ctacccgtg gatactgaga cgccacaggt ggcgtccgtcg aatccaacct 1080

cagaggagtt gaatccgatt tcgatgagct tggcgccgac taattgaggg atctctacgt 1140

	aagcgctggt acggacctcg ccaacaacat ggacgattcc ggtggtgacc acagttcca	1200
	ctgcgacgctg cgactgcgga ttttttcga gcagcgcgtc caaaatggta tcggaaatag	1260
5	catcacatat ttgtctgga tgtcccttag ttacagattc actggtgaac aaacggacgg	1320
	cggttggctg agccacaaat acccttctt cgaagaagtt gagaataaat agtcttaat	1380
10	aaaaaaaacc aatatagacc aagctgtcta aaactgcaat gtcagtggtc tagctggatt	1440
	tttctagact tcgcgatacg ccagtgcgc gtcccaaatt tgcgcagcaa cctcgatttt	1500
	gctgccgtgc tccacatcga ctaccccacc gtgagcatcc aaaatccagc cctcattgtg	1560
15	ctttggcca aacactttgc ccatgcccac ctcattacac atgaggaggt cgccagccctt	1620
	cttccccggaa tttaaatcgc tagcgggctg cttaaggaag cggAACACGT agaaAGCCAG	1680
20	tcccgagaaa cggtgtgac cccggatgaa tgtcagctac tggctatct ggacaaggga	1740
	aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtage ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga	1800
	ctggggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa	1860
25	ggttgggaag ccctgcaaag taaaactggat ggcttcttg ccgccaagga tctgatggcg	1920
	caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg ttcgcatga ttgaacaaga	1980
30	tggattgcac gcagggtctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcgct atgactggc	2040
	acaacagaca atcggctgct ctgatgcgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgc	2100
	ggttctttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc	2160
35	gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tcctgcgc gctgtgcgt acgttgcac	2220
	tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgcgc gggcaggatc tcctgtcatc	2280
40	tcaccttgct cctgcccaga aagtatccat catggctgat gcaatgcgc ggctgcatac	2340
	gcttgatccg gtcacccgtt cattcgacca ccaagcggaa catcgcatcg agcgagcacg	2400
	tactcgatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct	2460
45	cgcgcagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggccgcgtt cccgcggcg aggatctcg	2520
	cgtgacccat ggcgtgcct gcttgcggaa tatcatggtg gaaaatggcc gctttctgg	2580
50	attcategac tgggtgtggc ggaccgtat caggacatag cggtggctac	2640
	ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg	2700
	tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttcg	2760
55	agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgcacgc ccaacctgcc atcacgagat	2820
	ttcgattcca cggccgcctt ctatgaaagg ttgggttcg gaatcgaaaa cggggacgcc	2880
	ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgc cgcgtacgc	2940

	gccccggccg	gcccggtgtg	aaataccgca	cagatgcgt	aggagaaaaat	accgcac	3000
5	gcgccttcc	gcttcctcgc	tcactgactc	gctgcgc	gtcggtcg	tgcggcg	3060
	ggtatcagct	caactcaaagg	cggttaatacg	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	3120
	aaagaacatg	tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgc	3180
10	ggcgtttcc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	3240
	gaggtggcga	aacccgacag	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	3300
15	cgtgcgtct	cctgttccga	ccctgcccgt	taccggatac	ctgtccgcct	tttcccttc	3360
	gggaagcgtg	gcgccttctc	atagctcacg	ctgttaggtat	ctcagttcgg	tgttaggtcgt	3420
	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttac	3480
20	cggtaactat	cgttttgagt	ccaacccgg	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	3540
	ca	ctggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	gctacagagt	3600
	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttgg	atctgcgtc	tgctgaagcc	3660
25	agttaccttc	ggaaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccgc	aaacaaacca	ccgctggtag	3720
	cggtggttt	tttggggca	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	3780
30	tcctttgate	ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtgaaac	gaaaactcac	gttaaggat	3840
	tttggtcatg	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	ctttaaagg	ccggccgcgg	3900
35	ccgcgc	aaag	tcccgcttcg	tgaaaattt	cgtgcgcgt	gat	3960
	aacgaacgtt	cgttataatg	gtgtcatgac	cttcacgacg	aagtactaaa	attggccgaa	4020
	atcatcagct	atggatctc	ctgatgtcgc	gctggagtcc	gacgcgc	atgctgcgt	4080
40	cgat	ttaaaa	acggtgatcg	gat	tttcccg	agctctcgat	4140
	acgagactgg	gccagtgc	cgagcgac	ct	aaaactctc	gtggcggatc	4200
	ggctgac	gag	ctgcgtgc	gc	ggcagcg	aggaggacgc	4260
45	cagttgc	cc	tactgcgt	gc	cttgcattcc	tcccccgc	4320
	aaaatattgc	tcagatgcgt	gtcgtgc	gc	agccagccgc	gagcgcgc	4380
50	cgccgaggag	ctggaggcgg	ctaggtcgca	aatggcg	ctg	gaagtgcgc	4440
	aattttggcc	atggcg	tca	cagagctgga	agcggc	agc	4500
55	gg	ccgc	aa	acatcgtaaa	tgccgc	ttt	4560
	gacgtgtc	ag	ca	acatcgtaaa	tgccgc	ttt	4620
	cgcacaggcg	gcaagaagcg	ataagctgca	cgaataac	ctg	aaaaatgtt	4680

	gagcggtAAC tcacaggGCG tcggctaacc cccAGTccaa acctggaga aagcgctcaa	4740
	aatgacttC agcggattCA cgagacATTG acacACCGC ctggAAATTt tccgctgatC	4800
5	tgttcgacAC ccATcccGAG ctcgcGctGC gatcacgtGG ctggacgAGC gaagaccGCC	4860
	gcgaATTccT cgctCACCTG ggcAGAGAAA ATTCCAGGG cAGcaAGACC CGCgACTTCG	4920
10	ccAGCGCTTG gatCAAAGAC cCGGACACGG agAAACACAG CCAGAAGTTAT ACCGAGTGG	4980
	ttcaAAATCG CTTGCCCCGT GCCAGTATGT tgctCTGACG cacGCGcAGC acGcAGCCGT	5040
	gCTTGTCCtG gACATTGATG tgCCGAGCCA CCAGGCCGGC gggAAAATCG AGCACGTAAA	5100
15	ccccGAGGTC tacGCGATTt TGGAGCCTG ggcACGcCTG gaaaaAGCgC cAGCTTGGAT	5160
	cggcGtGAAT ccACTGAGCG ggAAATGCCA GCTCATCTGG CTCATTGATC CGGTGTATGC	5220
20	cgcAGCAGGC ATGAGCAGCC cGAATATCGC CCTGCTGGCT GCAACGACCG aggAAATGAC	5280
	ccgcGTTTC ggCGCTGACC aggCTTTTC ACATAGGCTG AGCCGTGGCC ACTGCACTCT	5340
	ccgACGATCC cAGCCGTACC GCTGGCATGC CCAGCACAAT CGCGTGGATC GCCTAGCTGA	5400
25	tCTTATGGAG GTTGTcGCA TGATCTCAGG CACAGAAAAA CCTAAAAAAAC GCTATGAGCA	5460
	ggAGTTTCT AGCGGACGGG CACGTATCGA AGCGGCAAGA AAAGCCACTG CGGAAGCAAA	5520
30	AGCACTTGCC ACgCTTGAAG CAAGCCTGCC GAGCGCCGCT GAAGCGTCTG GAGAGCTGAT	5580
	CGACGGCGTC CGTGTCCtCT GGACTGCTCC AGGGCGTGCC GCCCGTGTATG AGACGGCTT	5640
	TGCCCACGCT TTGACTGTGG GATACCAGTT AAAAGCGGCT GGTGAGCGCC TAAAAGACAC	5700
35	CAAGGGTcat CGAGCCTACG AGCGTGCCTA CACCGTCGCT CAGGCGGTGCG GAGGAGGCCG	5760
	TGAGCCTGAT CTGCCGCCGG ACTGTGACCG CCAGACGGAT TGGCCGCGAC GTGTGCGCGG	5820
40	CTACGTCGCT AAAGGCCAGC CAGTCGCTCC TGCTCGTCAG ACAGAGACGC AGAGCCAGCC	5880
	GAGGCGAAAAA GCTCTGGCCA CTATGGGAAG ACGTGGCGGT AAAAAGGCCG CAGAACGCTG	5940
	GAAAGACCCA AACAGTGAgt ACGCCCCAGC ACAGCGAGAA AAACCTAGCTA AGTCCAGTCA	6000
45	ACGACAAAGCT AGGAAAGCTA AAGGAATCG CTGACCATT GCAGGTTGGT TTATGACTGT	6060
	TGAGGGAGAG ACTGGCTCGT GGCCGACAAT CAATGAAGCT ATGTCTGAAT TTAGCGTGTc	6120
50	ACGTCAgACC GTGAATAGAG CACTTAAGGT CTGCGGGCAT TGAACCTCCA CGAGGACGCC	6180
	GAAAGCTTCC CAGTAAATGT GCCATCTCGT AGGCAGAAAAA CGGTTCCCCC GTAGGGCTC	6240
	TCTCTTGGCC TCTTTCTAG GTCGGGCTGA TTGCTCTGA AGCTCTCTAG GGGGGCTCAC	6300
55	ACCATAGGCA GATAACGTTc CCCACCGGCT CGCCTCGTAA GCGCACAAGG ACTGCTCCCA	6360
	AAGATCTCA AAGCCACTGC CGCGACTGCC TTGCGGAAGC CTTGCCCCGC GGAAATTCC	6420
	TCCACCGAGT TCgtGCACAC CCCTATGCCA AGCTTCTTC ACCCTAAATT CGAGAGATTG	6480

5 gattcttacc gtggaaattc ttgcaaaaaa tcgtccctg atcgcccttg cgacgttggc 6540
gtcggtgccg ctggttgcgc ttggcttgac cgacttgatc agcggccgct cgatttaat 6600
ctcgagaggc ctgacgtcgg gcccggtacc a 6631

10 <210> 16
<211> 407
<212> PRT

15 16 <213> *Corynebacterium glutamicum*

20 <400> 16
Val Ala Gln Pro Thr Ala Val Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr
1 5 10 15

25 Glu Gly His Pro Asp Lys Ile Cys Asp Ala Ile Ser Asp Thr Ile Leu
20 25 30

30 Asp Ala Leu Leu Glu Lys Asp Pro Gln Ser Arg Val Ala Val Glu Thr
35 40 45

35 Val Val Thr Thr Gly Ile Val His Val Val Gly Glu Val Arg Thr Ser
50 55 60

40 Ala Tyr Val Glu Ile Pro Gln Leu Val Arg Asn Lys Leu Ile Glu Ile
65 70 75 80

45 Gly Phe Asn Ser Ser Glu Val Gly Phe Asp Gly Arg Thr Cys Gly Val
85 90 95

50 Ser Val Ser Ile Gly Glu Gln Ser Gln Glu Ile Ala Asp Gly Val Asp
100 105 110

55 Asn Ser Asp Glu Ala Arg Thr Asn Gly Asp Val Glu Glu Asp Asp Arg
115 120 125

Ala Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asn Glu
130 135 140

Thr Glu Glu Tyr Met Pro Leu Pro Ile Ala Leu Ala His Arg Leu Ser
145 150 155 160

Arg Arg Leu Thr Gln Val Arg Lys Glu Gly Ile Val Pro His Leu Arg
165 170 175

5 Pro Asp Gly Lys Thr Gln Val Thr Phe Ala Tyr Asp Ala Gln Asp Arg
180 185 190

10 Pro Ser His Leu Asp Thr Val Val Ile Ser Thr Gln His Asp Pro Glu
195 200 205

15 Val Asp Arg Ala Trp Leu Glu Thr Gln Leu Arg Glu His Val Ile Asp
210 215 220

20 Trp Val Ile Lys Asp Ala Gly Ile Glu Asp Leu Ala Thr Gly Glu Ile
225 230 235 240

Thr Val Leu Ile Asn Pro Ser Gly Ser Phe Ile Leu Gly Gly Pro Met
245 250 255

25 Gly Asp Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly
260 265 270

30 Gly Met Ala Arg His Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser
275 280 285

35 Lys Val Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn
290 295 300

40 Ile Val Ala Ala Gly Leu Ala Asp Arg Ala Glu Val Gln Val Ala Tyr
305 310 315 320

Ala Ile Gly Arg Ala Lys Pro Val Gly Leu Tyr Val Glu Thr Phe Asp
325 330 335

45 Thr Asn Lys Glu Gly Leu Ser Asp Glu Gln Ile Gln Ala Ala Val Leu
340 345 350

50 Glu Val Phe Asp Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Glu Leu Asp Leu
355 360 365

55 Leu Arg Pro Ile Tyr Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg
370 375 380

Thr Asp Leu Asp Leu Pro Trp Glu Ala Ile Asp Arg Val Asp Glu Leu
385 390 395 400

Arg Ala Ala Leu Lys Leu Ala
405
5

<210> 17
<211> 38
10 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
15

<400> 17
gattcgacgg acgcacccgt ggcgtctcag tatccatc 38
20 <210> 18
<211> 38
25 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
30 <400> 18
gatggatact gagacgccag cggtgcttcc gtcgaatc 38
35 <210> 19
<211> 6631
<212> DNA
40 <213> Künstliche Sequenz
45 <400> 19
cgcgcatat gcaggtgagg taaccccaaa agaggtaaaa cccgcgccac cgactttca 60
ggagcgggga cgcggttt tgccatgaat ccgaagatac tacatcagat ttttaggcca 120
50 acttgagggc tgcgcaagt tcatcaacgc ggtcgatagc ctcccaagga aggtccaaat 180
cagtgcgacc aaagtggccg taggcagcag tgtcagcgta gatcggacga agcagatcaa 240
55 gctcacggat aattgctgct ggacgcaggtaaaaggtttc aacgtaaaat ccgactggct 300
gctcgctcgct caggccttcc ttgttgggtgt caaagggttc aacgtaaaat ccgactggct 360
ttgcgcgtcc aatggcgtat gcaacctgaa cttcagcgatcagcaagg cctgctgcca 420

	cgatgttctt	tgc	tacccaa	cgc	atggcgt	atgc	agcaga	gccc	ttgttggat	480							
	ccttaccgga	aat	gtctcca	ccaccatggc	gag	ccatgcc	acc	gttagta	tccacgatga	540							
5	tcttgcggcc	gg	tca	gacccc	gcat	caccca	tgg	ggcacc	cagaatgaag	600							
	gg	ttgatcaa	cac	gggtgatc	tcac	ccgggttg	cc	agatcctc	aatgcctgcg	660							
10	cccaatcaat	gac	gttgc	cgc	agttggg	tttccaa	acc	ca	tgcacggtca	720							
	cgt	gtgggt	gg	agatgaca	acgg	tatcca	gg	tggttgc	gc	atcgat	780						
	cgaagggtgac	ct	gggtttttt	ccgt	tctggac	gc	agggtgagg	aa	cgatgccc	tcttacgaa	840						
15	cctgggtcag	acg	acgtgac	ag	tccgtgcg	cc	aaacgcgat	ag	gaagaggg	atgtactt	900						
	cgg	tttcgtt	gg	ttgcgttag	cc	gaacatca	gg	ccctggtc	gc	agcacct	960						
20	cttcttcaac	gtc	gcccgtt	gt	gcgggc	tt	cg	tggagtt	at	ccacgc	tca	1020					
	cct	gggactg	ct	caccgatg	gata	ctgaga	cg	ccagcggt	gc	gtccgtcg	aatccaa	1080					
	cagaggagtt	ga	atccgatt	tc	gatgagct	tg	ttgcggac	ta	ttgaggg	at	ctctacgt	1140					
25	aagcgcttgt	acgg	acacctcg	cc	aaacaacat	gg	acgattcc	gg	tggtgacc	ac	agtttcca	1200					
	ct	gcgacgcg	cg	actgcgga	tct	tttcga	gc	agcgcgtc	ca	aaatggta	tcgaaatag	1260					
30	catcacat	at	ttgtctgga	tgt	ccctcag	tt	acagattc	ac	ttgtgaac	aa	acggacgg	1320					
	cgg	ttggctg	ag	ccacaaaat	ac	ccttctt	cg	aagaagtt	ga	gataaaat	agtcttaa	1380					
	aaaaaaacc	aa	atata	gacc	aa	actgtcta	aa	actgcaat	gt	cgtggt	tagctggatt	1440					
35	tttctagact	tc	gcgata	cc	agtgc	cc	gc	gt	ccaaatt	tg	cgacgaa	cctcgat	1500				
	g	tgc	ccgtgc	tcc	acatcg	ct	accc	cc	gtgac	at	cc	cattgt	1560				
40	cttttgc	cc	aacacttgc	cc	atgc	cc	ac	ct	cattacac	at	gaggaggt	cg	agcc	1620			
	ctt	cccggg	tt	taa	atcg	ta	gg	gg	ctac	tg	ggat	cg	ac	1680			
	tcc	cgaaaa	cg	gtgc	tgc	cc	ggat	ga	tgc	at	ct	gg	acaagg	1740			
45	aaac	gc	aa	gca	ag	aa	g	ca	gt	gg	tt	gt	gg	1800			
	ct	gggc	gtt	t	at	gg	ac	g	ac	at	cc	tc	tgt	1860			
50	gg	ttgg	gg	aa	cc	ct	tg	ca	aa	tt	tt	tc	gt	gg	1920		
	cag	gggat	ca	gat	tc	aa	gac	agg	at	gg	at	cg	at	gg	1980		
	tgg	attgc	ac	gat	tc	cc	ggc	gt	tt	gg	at	cg	tc	at	2040		
55	aca	ac	ac	atcg	gt	cc	gc	gt	tt	cc	cc	tc	tt	gt	tc	2100	
	g	tt	ttt	tt	gt	ca	aa	ac	cc	cc	cc	cc	cc	tc	ac	2160	
	gc	gg	ct	at	cg	tt	gg	tc	cc	ca	ag	gg	cc	ac	gt	tc	2220

	tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgcgg gggcaggatc tccgtcatc	2280
5	tcacccgtc cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac	2340
	gcttgcattcg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg	2400
	tactcgatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct	2460
10	cgcgcagcc gaactgttcg ccaggctaa ggcgcgcattg cccgacggcg aggatctcg	2520
	cgtgaccat ggcgatgcct gcttgcggaa tatcatggtg gaaaatggcc gctttctgg	2580
15	attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgtat caggacatag cggtggctac	2640
	ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg	2700
	tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttcg	2760
20	agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcaccgat	2820
	ttcgattcca ccgcgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgaaaa ccgggacgcc	2880
25	ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcccc cgctagccgc	2940
	gcgcggcccg gcccgggttg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaaat accgcatacg	3000
	gcgcctttcc gtttctcgc tcactgactc gctgcgtcg gtcgttcggc tgccggcagc	3060
30	ggtatcagct cactcaaagg cggtaataacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg	3120
	aaagaacatcg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgc	3180
35	ggcgttttc cataggctcc gcgcgcctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca	3240
	gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttcccccgt gaagctccct	3300
	cgtgcgtct cctgttccga ccctgcgcgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc	3360
40	ggaaagcgtg gcgccttc atagctcaacg ctgttaggtat ctcagttcgg tgcgttcgt	3420
	tgcgtccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccggtcag cccgaccgct gcgccttatac	3480
45	cggtaactat cgtcttgcgt ccaacccgggt aagacacgac ttatgcac tggcagcagc	3540
	cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgcgttcgt gctacagagt tcttgaagt	3600
	gtggccctaac tacggctaca cttagaggac agtatttgcgt atctgcgtc tgctgaagcc	3660
50	agttaccttc gaaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgcgttgc	3720
	cggtgttttt tttgtttgcgt agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga	3780
55	tcctttgtat tttctacgg ggtctgacgc tcagtgaaac gaaaactcac gttaaggat	3840
	tttggtcgtc agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg	3900
	ccgcgcggaaag tcccgcttcg tgaaaattt cgtgcgcgt gatttccgc caaaaacttt	3960

	aacgaacgtt	cgttataatg	gtgtcatgac	cttcacgacg	aagtactaaa	attggcccgaa	4020
	atcatcagct	atggatctct	ctgatgtcgc	gctggagtcc	gacgcgcctcg	atgctgccgt	4080
5	cgatttaaaa	acggtgatcg	gattttccg	agctctcgat	acgacggacg	cgcgcacatc	4140
	acgagactgg	gccagtgccg	cgagcgcacct	agaaaactctc	gtggcggatc	ttgaggagct	4200
10	ggctgacgag	ctgcgtgctc	ggccagcgcc	aggaggacgc	acagtagtgg	aggatgcaat	4260
	cagttgcgcc	tactgcggtg	gcctgattcc	tccccggcct	gacccgcgag	gacggcgcgc	4320
	aaaatattgc	tcagatgcgt	gtcgtgccgc	agccagccgc	gagcgcgcac	acaaacgcac	4380
15	cgcgcaggag	ctggaggcgg	ctaggtcgca	aatggcgctg	gaagtgcgtc	ccccgagcga	4440
	aattttggcc	atggtcgtca	cagagctgga	agcggcagcg	agaattatcg	cgatcgtggc	4500
20	ggtgcggca	ggcatgacaa	acatcgtaaa	tgccgcgttt	cgtgtgccgt	ggccgcggcag	4560
	gacgtgtcag	cgcgcacc	acctgcaccc	aatcggcagc	agcgtgcgc	gtcggaaaaag	4620
	cgcacaggcg	gcaagaagcg	ataagctgca	cgaatacctg	aaaaatgtt	aacgcggcg	4680
25	gagcgtaac	tcacagggcg	tcggctaacc	cccagtccaa	acctgggaga	aagcgctcaa	4740
	aaatgactct	agcggattca	cgagacattg	acacaccggc	ctggaaattt	tccgctgatc	4800
30	tgttcacac	ccatcccgag	ctcgcgtgc	gatcacgtgg	ctggacgagc	gaagaccgccc	4860
	gcgaattct	cgtcacctg	ggcagagaaaa	atttccaggg	cagcaagacc	cgcgacttcg	4920
	ccagcgctt	gatcaaagac	ccggacacgg	agaaaacacag	ccgaagttat	accgagttgg	4980
35	ttcaaaaatcg	cttgcgggt	gccagtatgt	tgctctgacg	cacgcgcage	acgcagccgt	5040
	gcttgcctg	gacattgatg	tgccgagcca	ccaggccggc	ggggaaaatcg	agcacgtaaa	5100
40	ccccgaggtc	tacgcgattt	tggagcgctg	ggcacgcctg	aaaaaagcgc	cagcttggat	5160
	cggcgtgaat	ccactgagcg	ggaaatgcac	gctcatctgg	ctcattgatc	cggtgtatgc	5220
	cgcagcaggc	atgagcagcc	cgaatatgcg	cctgctggct	gcaacgaccg	aggaaaatgac	5280
45	ccgcgttttc	ggcgctgacc	aggcttttc	acataggctg	agccgtggcc	actgcactct	5340
	ccgacgatcc	cagccgtacc	gctggcatgc	ccagcacaat	cgcgtggatc	gcctagctga	5400
50	tcttatggag	gttgcgcac	tgatctcagg	cacagaaaaa	cctaaaaaac	gctatgagca	5460
	ggagtttct	agcggacggg	cacgtatcga	agcggcaaga	aaagccactg	cggaagcaaa	5520
	agcacttgcc	acgcttgcac	caagcctgac	gagcgcggct	gaagcgtctg	gagagctgat	5580
55	cgacggcgtc	cgtgtccct	ggactgctcc	agggcgtgcc	gcccgtatg	agacggctt	5640
	tcgcccacgt	ttgactgtgg	gataccagtt	aaaagcggt	ggtgagcgc	taaaagacac	5700
	caaggggtcat	cgagcctacg	agcgtgccta	caccgtcgct	caggcggtcg	gaggaggccg	5760

	tgagcctgat ctgccgcgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg	5820
5	ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtag acagagacgc agagccagcc	5880
	gaggcgaaaa gctctggcca ctatggaaag acgtggcggt aaaaaggccg cagaacgctg	5940
	gaaagaccca aacagtgagt acgcccgagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca	6000
10	acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttgt ttatgactgt	6060
	tgagggagag actggctcggt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc	6120
15	acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc	6180
	gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcggt aggcaaaaa cggttcccccc gtagggtctc	6240
	tctctggcc tcctttctag gtcgggctga ttgctttga agctctctag gggggctcac	6300
20	accataggca gataacgttc cccaccggct cgcctcgtaa ggcgcacaagg actgctccca	6360
	aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttgcgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc	6420
25	tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttcttc accctaaatt cgagagattg	6480
	gattcttacc gtggaaattc ttgcaaaaaaaa tcgtccccctg atcgcccttg cgacgttggc	6540
	gtcggtgccg ctgggttgcgc ttggcttgac cgacttgatc agcggccgct cgatttaat	6600
30	ctcgagaggc ctgacgtcgg gcccggtaacc a	6631
	<210> 20	
35	<211> 5863	
	<212> DNA	
40	<213> Künstliche Sequenz	
	<400> 20	
45	tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gcaggtgagg taaccccaa	60
	agaggtaaaa cccgcgccac cgactttca ggagcggggc cgcgggttt tgccatgaat	120
	ccgaagatac tacatcagat ttttaggcca acttgagggc tgcgcaagt tcataacgc	180
50	ggtcgatagc ctcccaagga aggtccaaat cagtcgcacc aaagtggccg taggcagcag	240
	tgtcagcgta gatcgacgca agcagatcaa gtcacggat aattgctgct ggacgcaggt	300
55.	caaagacccca aacacggca gcctgaatct gtcgtcgct caggccttcc ttgttggtgt	360
	caaaggtttc aacgtaaagt ccgactggct ttgcgcgtcc aatggcgtat gcaacctgaa	420
	cttcagcgcg atcagcaagg cctgctgcca cgtatgttctt tgctacccaa cgcatggcgt	480

	atgcagcaga gcggtccacc ttgcttggat ccttacccga gaatgtcca ccaccatggc	540
	gagccatgcc accgttagta tccacgatga tcttgccggcc ggtcagaccc gcatcaccca	600
5	tggggccacc cagaatgaag gaacctgaag ggttgatcaa cacggtgatc tcaccgggttg	660
	ccagatccctc aatgcctgctg tctttgatta cccaatcaat gacgtgttcg cgcaagtggg	720
10	tttccaacca tgcacggtca acttctgggt cgtgctgggt ggagatgaca acggtatcca	780
	ggtgtggctagg gcggtcttgc gcatacgatg cgaaggtgac ctgggtttttt ccgtctggac	840
	gcaggtgagg aacgatgccc tctttacgaa cctgggtcag acgacgtgac agtcggtgcg	900
15	ccaacgcgat aggaagaggc atgtactctt cggttgcgtt ggtggcgttag ccgaacatca	960
	ggccctggtc gccagcacct gcgccgtcgt ctcttcAAC gtcggccgtt gtgcgggctt	1020
20	cgtcgaggatt atccacgccc tcagcgattt cctgggactg ctcaccgatg gatactgaga	1080
	cgcgcagggt gctccgtcg aatccaacct cagaggagtt gaatccgatt tcgatgagct	1140
	tgttgcggac taattgaggg atctctacgt aagcgctggt acggacctcg ccaacaacat	1200
25	ggacgattcc ggtggtgacc acagttcca ctgcgacgctg cgactgcggg tcttttcga	1260
	gcagcgcgtc caaaatggta tcggaaatag catcacatat tttgtctggta tgccctcag	1320
30	ttacagattc actggtaaac aaacggacgg cggtggctg agccacaaaat acccttctt	1380
	cgaagaagtt gagaataaaat agtcttaaat aaaaaaaaaacc aatatacgacc aagctgtcta	1440
	aaactgcaat gtcagtggtc tagctggatt ttcttagact tcgcgatacg ccagtgcgc	1500
35	gtccccaaatt tgccgcagcaa cctcgatttt gctgccgtgc tccacatcga ctacccacc	1560
	gtgagcatcc aaaatccagc cctcattgtg cttttggccaa aacacttgc ccatgcccac	1620
40	ctcattacac atgaggaggt cgccagccctt cttccggga tttaaatcgc tagcgggctg	1680
	ctaaaggaag cgaaacacgt agaaagccag tccgcagaaa cggtgctgac cccggatgaa	1740
	tgtcagctac tggctatct ggacaaggaa aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtac	1800
45	ttgcagtggg cttacatggc gatactaga ctggcggtt ttatggacag caagcgaacc	1860
	ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa gggtggaaag ccctgcaaag taaaactggat	1920
50	ggctttcttg ccgccaagga tctgtatggcg cagggatca agatctgatc aagagacagg	1980
	atgaggatcg tttcgcata ttaacaaga tggattgcac gcagggtctc cggccgctt	2040
	ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgtc ctgatgcgc	2100
55	cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgc ccc gggtttttt gtcaagaccc acctgtccgg	2160
	tgcctctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt	2220
	tccttgcga gctgtgtcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg	2280

	cgaagtgccg	gggcaggatc	tcctgtcatc	tcacccgtct	cctgcccaga	aagtatccat	2340
5	catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	gctacactgcc	cattcgacca	2400
	ccaagcgaaa	catcgcatcg	agcgagcacg	tactcgatg	gaagccggtc	ttgtcgatca	2460
	ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	cgcgcagcc	gaactgttcg	ccaggctcaa	2520
10	ggcgccatg	cccgacggcg	aggatctcg	cgtgaccat	ggcgatgcct	gcttgcgaa	2580
	tatcatggtg	gaaaatggcc	gcttttctgg	attcatcgac	tgtggccggc	tgggtgtggc	2640
15	ggaccgctat	caggacatag	cgttggctac	ccgtgatatt	gctgaagagc	ttggcggcga	2700
	atgggctgac	cgttccctcg	tgctttacgg	tatcgccgt	cccgatcg	agcgcatcg	2760
	cttctatcg	cttcttgacg	agttcttctg	agcgggactc	tggggttcga	aatgaccgac	2820
20	caagcgacgc	ccaaacctgcc	atcacgagat	ttcgattcca	ccggccgcctt	ctatgaaagg	2880
	ttgggcttcg	gaatcgaaaa	ccgggacgccc	ggctggatga	tcctccagcg	cggggatctc	2940
25	atgctggagt	tcttcgcccc	cgctageggc	gcgcggcccg	gccccgtgtg	aaataccgca	3000
	cagatcgta	aggagaaaaat	accgcatacg	gcgcctttcc	gcttcctcg	tcactgactc	3060
	gctgcgtcg	gtcggtcg	tgccggcagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaataacg	3120
30	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaag	gccagcaaaa	3180
	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcggttttc	cataggctcc	gccccctgaa	3240
35	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gagggtggcga	aacccgacag	gactataaag	3300
	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgtct	cctgttccga	ccctgcgcgt	3360
	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgcgttttc	atagctcagc	3420
40	ctgttaggtat	ctcagttcgg	tgttaggtcg	tcgcctcaag	ctgggtgtg	tgcacgaacc	3480
	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttatac	cggtaactat	cgtttgagt	ccaacccggt	3540
45	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	3600
	tgttaggcgt	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	3660
	agtatttttgt	atctgcgtc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaaagag	ttggtagctc	3720
50	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgcgtgttag	cggtggtttt	tttgggttgc	agcagcagat	3780
	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	3840
55	tcagtggAAC	aaaaactcac	gttaagggt	tttggtcatg	agattatcaa	aaaggatctt	3900
	cacctagatc	ttttaaagg	ccggccgcgg	ccgcatacg	cattttcttt	tgcgttttta	3960
	tttggtaact	gttaattgtc	cttggtaaag	gtgcgtgtct	ttgacaacag	atgtttctt	4020

	gcctttgatg ttcagcagga agctcgccgc aaacgttcatg tggggatctg cgtagaatcc	4080
	tctgtttgtc atatacgatc ttatcacgac attgtttctt ttcgcttgag gtacagcgaa	4140
5	gtgtgagtaa gtaaagggtta catcgtagg atcaagatcc attttaaca caaggccagt	4200
	tttgcggc ggcttgcgtatg ggccagttaa agaatttagaa acataaccaa gcatgtaaat	4260
10	atcgtagac gtaatgccgt caatcgatcat tttgatccg cgggagtcag tgaacaggta	4320
	ccatggccg ttcattttaa agacgttgcg gcgttcaatt tcattgttta ctgtgtttaga	4380
	tgcaatcagc ggtttcatca cttttttcag tgtgtatca tcgttagct caatcataacc	4440
15	gagagcgccg tttgtactt cagccgtgcg tttttatcg ctttgcagaa gtttttgcact	4500
	ttcttgacgg aagaatgatg tgctttgcc atagtatgct ttgttaataa aagattcttc	4560
20	gccttggtag ccatttcag ttccagtgtt tgcttcaat actaagtatt tggccctt	4620
	atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atgggtgtcg cctgagctgt agttgccttc	4680
	atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt tttccgtca ccgtcaaaga ttgatttata	4740
25	atcctctaca ccgttgcgtgt tcaaagatgt gtctgtatgc gatacgatcc cttgtgcagt	4800
	tgtcagtgtt tggttgcgtt aatgtttacc ggagaaatca gtgtagaata aacggatttt	4860
30	tccgtcagat gtaaatgtgg ctgaacctga ccattttgtt gttggctt ttaggataga	4920
	atcatttgca tcgaatttgtt cgctgtctt aaagacgcgg ccagctttt tccagctgtc	4980
	aatagaagtt tcgcccactt tttgatagaa catgtaaatc gatgtgtatcc ccgcatttt	5040
35	aggatctccg gctaattgca agacgatgtg gtagccgtga tagttgcga cagtgccgtc	5100
	agcggtttgtt aatggccagc tgccttccaaac gtccaggcct tttgcagaag agatatttt	5160
40	aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atattttca ttttttgcgtt gttcaggat	5220
	ttgcagcata tcattggcgtt taatatggaa aatgcgttat gttccttattt atggctttt	5280
	gttcgtttctt ttgccttccaaac cttgagttgc gcctctgcg agcagtgcgg tagtaaagg	5340
45	taatactgtt gcttggatgg cttttttt gatgttcatc gttcatgtct cttttttat	5400
	gtactgtgtt agcggctgtc ttcttccaggc cttcctgtttt gaagatggca agtttagttac	5460
50	gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc caaagtatac actttgcctt	5520
	ttacacattt taggttttgc ctgttttatac agtaacaaac ccgcgcgtt tacttttca	5580
	cctcatttca ttagacttcc gtttggattt cttttttttt gttttttttt gttttttttt	5640
55	agaaaatcat aaaaggatcc gcagactacg ggcctaaaga actaaaaaat ctatctgtt	5700
	cttttcatcc tctgtatccc ttatgtttc tttttttttt gttttttttt gttttttttt	5760
	tcacaattca gaaaatatca taatatctca ttttactaaa taatagtgaa cggcaggat	5820

atgtgatggg taaaaagga tcggcgccg ctcgattaa atc 5863

5 <210> 21
<211> 1224
<212> DNA
10 <213> Künstliche Sequenz

15 <220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1224)
20 <223>

25 <400> 21
gtg gct cag cca acc gcc gtc cgt ttg ttc acc agt gaa tct gta act 48
Val Ala Gln Pro Thr Ala Val Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr
1 5 10 15

30 gag gga cat cca gac aaa ata tgt gat gct att tcc gat acc att ttg 96
Glu Gly His Pro Asp Lys Ile Cys Asp Ala Ile Ser Asp Thr Ile Leu
20 25 30

35 gac gcg ctg ctc gaa aaa gat ccg cag tcg cgc gtc gca gtg gaa act 144
Asp Ala Leu Leu Glu Lys Asp Pro Gln Ser Arg Val Ala Val Glu Thr
35 40 45

40 gtg gtc acc acc gga atc gtc cat gtt gtt ggc gag gtc cgt acc agc 192
Val Val Thr Thr Gly Ile Val His Val Val Gly Glu Val Arg Thr Ser
50 55 60

45 gct tac gta gag atc cct caa tta gtc cgc aac aag ctc atc gaa atc 240
Ala Tyr Val Glu Ile Pro Gln Leu Val Arg Asn Lys Leu Ile Glu Ile
65 70 75 80

50 gga ttc aac tcc tct gag gtt gga ttc gac gga cgc acc gct ggc gtc 288
Gly Phe Asn Ser Ser Glu Val Gly Phe Asp Gly Arg Thr Ala Gly Val
85 90 95

55 tca gta tcc atc ggt gag cag tcc cag gaa atc gct gac ggc gtg gat 336
Ser Val Ser Ile Gly Glu Gln Ser Gln Glu Ile Ala Asp Gly Val Asp
100 105 110

55 aac tcc gac gaa gcc cgc acc aac ggc gac gtt gaa gaa gac gac cgc 384
Asn Ser Asp Glu Ala Arg Thr Asn Gly Asp Val Glu Glu Asp Asp Arg
115 120 125

gca ggt gct ggc gac cag ggc ctg atg ttc ggc tac gcc acc aac gaa 432
Ala Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asn Glu

	130	135	140	
5	acc gaa gag tac atg cct ctt atc gcg ttg gcg cac cga ctg tca Thr Glu Glu Tyr Met Pro Leu Pro Ile Ala Leu Ala His Arg Leu Ser 145 150 155 160			480
10	cgt cgt ctg acc cag gtt cgt aaa gag ggc atc gtt cct cac ctg cgt Arg Arg Leu Thr Gln Val Arg Lys Glu Gly Ile Val Pro His Leu Arg 165 170 175			528
15	cca gac gga aaa acc cag gtc acc ttc gca tac gat gcg caa gac cgc Pro Asp Gly Lys Thr Gln Val Thr Phe Ala Tyr Asp Ala Gln Asp Arg 180 185 190			576
20	cct agc cac ctg gat acc gtt gtc atc tcc acc cag cac gac cca gaa Pro Ser His Leu Asp Thr Val Val Ile Ser Thr Gln His Asp Pro Glu 195 200 205			624
25	gtt gac cgt gca tgg ttg gaa acc caa ctg cgc gaa cac gtc att gat Val Asp Arg Ala Trp Leu Glu Thr Gln Leu Arg Glu His Val Ile Asp 210 215 220			672
30	tgg gta atc aaa gac gca ggc att gag gat ctg gca acc ggt gag atc Trp Val Ile Lys Asp Ala Gly Ile Glu Asp Leu Ala Thr Gly Glu Ile 225 230 235 240			720
35	acc gtg ttg atc aac cct tca ggt tcc ttc att ctg ggt ggc ccc atg Thr Val Leu Ile Asn Pro Ser Gly Ser Phe Ile Leu Gly Gly Pro Met 245 250 255			768
40	ggt gat gcg ggt ctg acc ggc cgc aag atc atc gtg gat acc tac ggt Gly Asp Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly 260 265 270			816
45	ggc atg gct cgc cat ggt ggt gga gca ttc tcc ggt aag gat cca agc Gly Met Ala Arg His Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser 275 280 285			864
50	aag gtg gac cgc tct gct gca tac gcc atg cgt tgg gta gca aag aac Lys Val Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn 290 295 300			912
55	atc gtg gca gca ggc ctt gct gat cgc gct gaa gtt cag gtt gca tac Ile Val Ala Ala Gly Leu Ala Asp Arg Ala Glu Val Gln Val Ala Tyr 305 310 315 320			960
60	gcc att gga cgc gca aag cca gtc gga ctt tac gtt gaa acc ttt gac Ala Ile Gly Arg Ala Lys Pro Val Gly Leu Tyr Val Glu Thr Phe Asp 325 330 335			1008
65	acc aac aag gaa ggc ctg agc gac gag cag att cag gct gcc gtg ttg Thr Asn Lys Glu Gly Leu Ser Asp Glu Gln Ile Gln Ala Ala Val Leu 340 345 350			1056
70	gag gtc ttt gac ctg cgt cca gca gca att atc cgt gag ctt gat ctg Glu Val Phe Asp Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Glu Leu Asp Leu 355 360 365			1104
75	ctt cgt ccg atc tac gct gac act gct gcc tac cac ttt ggt cgc			1152

Leu Arg Pro Ile Tyr Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg
 370 375 380

5 act gat ttg gac ctt cct tgg gag gct atc gac cgc gtt gat gaa ctt 1200
 Thr Asp Leu Asp Leu Pro Trp Glu Ala Ile Asp Arg Val Asp Glu Leu
 385 390 395 400

10 cgc gca gcc ctc aag ttg gcc taa 1224
 Arg Ala Ala Leu Lys Leu Ala
 405

<210> 22

15 <211> 407

<212> PRT

20 <213> Künstliche Sequenz

<400> 22

25 Val Ala Gln Pro Thr Ala Val Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr
 1 5 10 15

30 Glu Gly His Pro Asp Lys Ile Cys Asp Ala Ile Ser Asp Thr Ile Leu
 20 25 30

35 Asp Ala Leu Leu Glu Lys Asp Pro Gln Ser Arg Val Ala Val Glu Thr
 35 40 45

40 Val Val Thr Thr Gly Ile Val His Val Val Gly Glu Val Arg Thr Ser
 50 55 60

45 Ala Tyr Val Glu Ile Pro Gln Leu Val Arg Asn Lys Leu Ile Glu Ile
 65 70 75 80

50 Ser Val Ser Ile Gly Glu Gln Ser Gln Glu Ile Ala Asp Gly Val Asp
 100 105 110

55 Asn Ser Asp Glu Ala Arg Thr Asn Gly Asp Val Glu Glu Asp Asp Arg
 115 120 125

Ala Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asn Glu
 130 135 140

Thr Glu Glu Tyr Met Pro Leu Pro Ile Ala Leu Ala His Arg Leu Ser
145 150 155 160

5 Arg Arg Leu Thr Gln Val Arg Lys Glu Gly Ile Val Pro His Leu Arg
165 170 175

10 Pro Asp Gly Lys Thr Gln Val Thr Phe Ala Tyr Asp Ala Gln Asp Arg
180 185 190

15 Pro Ser His Leu Asp Thr Val Val Ile Ser Thr Gln His Asp Pro Glu
195 200 205

20 Val Asp Arg Ala Trp Leu Glu Thr Gln Leu Arg Glu His Val Ile Asp
210 215 220

Trp Val Ile Lys Asp Ala Gly Ile Glu Asp Leu Ala Thr Gly Glu Ile
225 230 235 240

25 Thr Val Leu Ile Asn Pro Ser Gly Ser Phe Ile Leu Gly Gly Pro Met
245 250 255

30 Gly Asp Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly
260 265 270

35 Gly Met Ala Arg His Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser
275 280 285

40 Lys Val Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn
290 295 300

Ile Val Ala Ala Gly Leu Ala Asp Arg Ala Glu Val Gln Val Ala Tyr
305 310 315 320

45 Ala Ile Gly Arg Ala Lys Pro Val Gly Leu Tyr Val Glu Thr Phe Asp
325 330 335

50 Thr Asn Lys Glu Gly Leu Ser Asp Glu Gln Ile Gln Ala Ala Val Leu
340 345 350

55 Glu Val Phe Asp Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Glu Leu Asp Leu
355 360 365

Leu Arg Pro Ile Tyr Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg
370 375 380

Thr Asp Leu Asp Leu Pro Trp Glu Ala Ile Asp Arg Val Asp Glu Leu
385 390 395 400

5

Arg Ala Ala Leu Lys Leu Ala
405

10 <210> 23

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

25 <222> (2) .. (2)

<223> Xaa=Phe oder Tyr

30 <220>

<221> MISC_FEATURE

35 <222> (3) .. (3)

<223> Xaa=Asp oder Ser

40 <220>

<221> MISC_FEATURE

45 <222> (4) .. (4)

<223> Xaa=beliebige Aminosäure

50 <220>

<221> MISC_FEATURE

55 <222> (5) .. (5)

<223> Xaa=beliebige Aminosäure

<220>

5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7) .. (7)
 <223> Xaa=von Cys verschiedene Aminosäure
10

<220>

15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6) .. (6)
 <223> Xaa=Ser oder Thr
20

<220>

25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8) .. (8)
 <223> Xaa=Gly oder Ala
30

<400> 23

35 Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val
 1 5